Laboratorio di Patologia Generale della R. Università di Bologna
diretto dal Prof. Comm. G. Tizzoni.

Dott. VITTORIO PUNTONI
Assistente

L'infezione e l'immunità da pneumococco di Fränkel. — Artrite. — Comportamento del sangue, vasi, midollo osseo, milza.

Estratto dall'*Archivio per le Scienze Mediche*
Vol. XXXVI, N. 3

TORINO
UNIONE TIPOGRAFICO-EDITRICE TORINESE
MILANO — NAPOLI — PALERMO — ROMA
1912

ARCHIVIO PER LE SCIENZE MEDICHE — Vol. XXXVI - N. 3.

Laboratorio di Patologia Generale della R. Università di Bologna,
diretto dal Prof. Comm. Guido Tizzoni.

Dott. VITTORIO PUNTONI
Assistente

L'infezione e l'immunità da pneumococco di Fränkel. — Artrite. — Comportamento del sangue, vasi, midollo osseo, milza.

Tav. IV.

I progressi fatti in questi ultimi tempi nella sieroterapia contro lo pneumococco hanno suscitato tutta una serie di ricerche intese ad indagare i vantaggi nel campo clinico. Ma nel campo sperimentale poco è stato fatto e necessitava dimostrare come tale sieroterapia agisca sistematicamente in animali sensibili iniettati con virus attivo.

Ho quindi studiato in primo luogo come i sieri terapeutici agiscano sull'infezione, cominciando da piccolissime dosi e insufficienti a salvare l'animale infettato, fino a dosi capaci di impedire qualsiasi sintomo morboso. Venivo in tal modo a produrre una serie di malattie di varia gravità, che hanno permesso di seguire tappa per tappa il modo di stabilirsi della immunità passiva antipneumococcica.

A tale studio, che costituisce la prima parte del presente lavoro, altri capitoli fanno seguito; uno ha avuto lo scopo di seguire i cambiamenti della formula leucocitaria in queste varie forme d'infezione; un altro è inteso a svelare le alterazioni istologiche del midollo delle ossa, della milza e dei vasi sanguigni. Fatti già messi in luce da Panichi, in alcune sue

ricerche ematologiche, indirizzarono ad un esame sistematico della formula leucocitaria in tutte le varie forme di malattia pneumococcica. Lo studio del midollo osseo, milza e vasi fu suggerito soprattutto dalla comparsa nel sangue di speciali elementi midollari ed endoteliali, nonchè dall'osservazione di M. Wassermann che additò il midollo delle ossa e gli organi linfoidi come luoghi di formazione degli anticorpi pneumococcici. Questi fatti indicarono senz'altro come tali organi dovessero giuocare un ruolo considerevole nella reazione contro lo pneumococco; ed erano convalidati anche dalla presenza di numerose emorragie nelle forme mortali di infezioni, ciò che denotava pure un'alterazione vasale.

Con lo studio del sangue, del midollo osseo e dei vasi viene così ad esser completata la ricerca microscopica delle lesioni sperimentali da pneumococco, che nel 1865 fu, per gli altri organi, eseguita da Foà e Bordoni-Uffreduzzi.

L'intero lavoro vien diviso nelle seguenti parti:

A) Infezione e sieroterapia pneumococcica; artrite;

B) Studio morfologico del sangue;

C) Studio istologico del midollo osseo, milza e vasi sanguigni;

D) Considerazioni generali sull' immunità antipneumococcica sperimentale, e conclusioni.

A) Infezione e sieroterapia pneumococcica. Artrite.

Il virus usato nelle presenti esperienze è uno stipite molto virulento, del tipo fibrinoso o settico di Foà. Le culture venivano fatte in brodo Tizzoni che favorisce la virulenza non acidificandosi durante lo sviluppo del germe, ed erano usate giovani di 18 ore. Veniva praticata nella vena marginale dell'orecchio l'iniezione di $^1/_{10}$ cc. di virus, dose molte volte mortale e capace di produrre con assoluta costanza la morte di conigli di qualsiasi peso in 15-20 ore. Quando volevo praticare la sieroterapia, l'iniezione del siero specifico era fatta subito prima di quella del virus nella vena marginale dell'orecchio.

Con questo mezzo, a seconda della quantità di siero iniettato, potevo ottenere una serie di malattie che da forme gra-

vissime e mortali arrivavano a lievissimo risentimento o alla completa immunità. Queste forme in ordine di gravità sono:

1) Setticemia mortale in 2-3 giorni;

2) Peritonite fibrinosa mortale in 5-10 giorni; più raramente pericardite e pleurite;

3) Meningo-mielite (rara), a volte guaribile;

4) Artrite; forma sempre guaribile;

5) Lieve risentimento senza localizzazione del virus;

6) Immunità.

Setticemia. — Avanti di parlare della setticemia mortale in 2-3 giorni, che si ottiene iniettando il virus assieme a piccole quantità di siero, è bene descrivere la setticemia acutissima mortale in 15-20 h., che colpisce i conigli iniettati con solo virus (controlli).

Già 2 ore dopo l'iniezione la temperatura dell'animale, che è circa 39° normalmente, comincia ad elevarsi; ed alla 6ª ora è già di 1° $^1/_2$ o 2° C. superiore alla norma.

Dopo tal limite di tempo oscilla fra i 40° $^1/_2$ ed i 41° C. per 8-10 h. all'incirca, fino a che approssimandosi la morte succede una rapida e forte ipotermia (V. grafica nel capitolo seguente).

Coll'elevarsi della temperatura compaiono varii sintomi rilevabili colla semplice osservazione: l'animale si muove con difficoltà, ha l'occhio spento, le orecchie abbattute, forte dispnea, non mangia. Nelle ultime ore la pelle diventa fredda specialmente nelle orecchie; una schiuma sanguinolenta alle narici indica spesso l'esistenza di emorragie polmonari. Nel sangue sono rilevabili microscopicamente coppie di pneumococchi. Il peso a causa della brevità della malattia non si modifica molto.

Nella forma più lenta di setticemia ottenuta iniettando virus e siero, l'andamento generale è lo stesso, soltanto il quadro si svolge più lentamente. Le alterazioni della temperatura si stabiliscono in un tempo più lungo, e i sintomi morbosi compaiono nel secondo giorno; il peso diminuisce considerevolmente specialmente nelle ultime 24 ore di malattia.

Le lesioni anatomo-patologiche nella setticemia sono semplici: vi è un tumor di milza notevole, duro, che dà poca succosità al taglio; sulla polpa quasi nera spiccano i follicoli rossastri. I reni sono in preda a grave nefrite parenchimatosa,

emorragica. L'intestino tenue mostra emorragie delle placche del Payer che si mostrano rosse, tumefatte e rilevate come bottoni. Emorragie retroperitoneali, polmonari, muscolari (con particolare frequenza nello psoas) e costantemente nel midollo delle ossa. Nessuna lesione vasale macroscopica.

Peritonite. — Si ottiene mediante una sieroterapia incompleta ma tuttavia più avanzata che nella forma precedente. Nelle prime 12 ore seguenti l'iniezione del virus e siero, gli animali rimangono in generale normali; è soltanto nel giorno seguente o nel 3° giorno che la temperatura si eleva notevolmente ed il peso decresce rapidamente; sintomo quest'ultimo importante, perchè parla per la prognosi infausta anche quando la temperatura non si eleva come di solito. I sintomi vera mente caratteristici compaiono soltanto verso la fine della malattia, e consistono in diarrea notevole, sete ostinata, retrazione e rigidità del treno posteriore che impedisce la normale andatura ed il salto, e infine ventre tumefatto e teso. In vicinanza della morte avviene una notevole ipotermia, meno rapida però che nella setticemia. La malattia dura in generale da 5 a 10 giorni.

Alla necroscopia la sierosa peritoneale si mostra appannata e ricoperta di stracci fibrinosi o fibrino-purulenti; vi sono aderenze estese ma tuttavia lasse e sbrigliabili; nelle parti declivi dell'addome si raccoglie un essudato fibrino-purulento spesso emorragico. Tutti gli organi, la milza compresa, sono normali e solo si mostrano ricoperti di fibrina. Fanno eccezione i reni, che sono in preda a nefrite. Le emorragie sono meno abbondanti che nella setticemia, ma tuttavia presenti. Il midollo delle ossa è fortemente iperemico. Vasi normali.

In casi rari invece di esser colpita la sierosa peritoneale, è colpita quella pleurica o quella pericardica. La pericardite e la pleurite fibrinosa sono forme gravissime, ancor più della peritonite. I sintomi generali (febbre e peso) si comportano come nella peritonite; variano invece le manifestazioni dovute alla localizzazione, predominando i sintomi cardio-polmonari che si palesano soprattutto con la dispnea.

Meningo-mielite. — È questa una forma piuttosto rara di malattia, a volte mortale, che per gravità può esser classificata

fra la peritonite e l'artrite. Gli animali nei primi giorni dopo la iniezione non risentono nulla; ma in seguito, senza elevazione notevole di temperatura, sono colpiti prima da paresi, poi da paralisi completa, flaccida, del treno posteriore che giace inerte e senza tono. Questa forma, dopo aver condotto a forte atrofia muscolare, può guarire. Alla necroscopia si trova una intensa infiammazione delle meningi e del sottostante midollo con emorragie sparse. Di questa forma si occupò specialmente PANICHI, il quale studiò istologicamente il midollo spinale dimostrandovi una lesione vasale, delle emorragie, ed una lesione degenerativa delle cellule nervose. Soltanto PANICHI estese forse il concetto di paralisi da mielite oltre i suoi veri limiti, ed invase il campo delle artriti, nelle quali i conigli mostrano uno spasmo dovuto a dolore, non a fatti nervosi centrali.

Artrite. — Si ottiene questa malattia quando assieme al virus si inietta una quantità di siero insufficiente a neutralizzare del tutto gli effetti del virus, ma capace di impedire la morte. In tali condizioni l'animale dopo uno o più giorni è febbricitante e zoppica da uno o al più da due degli arti; se l'arto colpito è uno dei posteriori viene tenuto sollevato ed aderente all'addome; se è uno degli anteriori l'animale vi si appoggia appena incespicando. Contemporaneamente l'articolazione colpita (quasi sempre il gomito o il ginocchio) è tumefatta e calda; spesso vi sono borsiti ed ascessi periarticolari. Dopo un decorso che varia da pochi giorni a più d'una settimana la febbre cade, lo zoppicamento cessa e la tumefazione diminuisce; l'animale può considerarsi guarito, ed è solo con un trauma portato nell'arto leso (ad es. una caduta) che si può provocare ancora lo zoppicamento.

Ma vi è una forma di artrite ben più grave; l'articolazione colpita è sempre quella del ginocchio. La febbre anzichè cadere presto continua per 2, 3 e più settimane, il peso diminuisce considerevolmente, la tumefazione e la zoppicatura sono spinte al massimo grado. L'arto colpito mentre è tenuto ostinatamente flesso e retratto nel cammino, viene invece disteso completamente nel riposo durante il qualè l'animale sta sdraiato sul fianco. Dopo le prime settimane comincia a comparire atrofia muscolare prima dell'arto leso e poi di tutto il treno posteriore;

spicca allora anche più evidente la tumefazione articolare che risulta a carico tanto delle parti molli, come dell'osso. Dopo un decorso di un mese o più, si inizia la guarigione: l'atrofia diminuisce, le funzioni dell'arto si ripristinano e rimane soltanto la tumefazione articolare che si conserva per moltissimo tempo. In capo a qualche settimana l'animale ha riacquistato il peso usuale ed è completamente guarito, non solo, ma ha acquistato un discreto grado di immunità.

L'artrite pneumococcica è una forma morbosa di alto interesse. Essa è già da tempo nota nel campo clinico per opera di molti medici che ne rilevarono la presenza specialmente nei bambini, e costituisce oggi una entità morbosa ben definita.

Dal lato sperimentale fu pure molto studiata; già Foà nei suoi studi sullo pneumococco aveva osservato che i conigli infettati a volte zoppicavano, e in tali casi trovava nella sinovia numerosi pneumococchi.

Il primo ad iniziare delle ricerche sperimentali sull'artrite da pneumococco fu Gabbi, che nel 1889 riprodusse l'affezione con iniezione di virus nelle articolazioni; non riuscì invece quando provò ad iniettare il germe sotto cute e produrre trauma o irritazione locale; e fallirono del pari i tentativi fatti nello stesso senso da Del-Vecchio e Parascandolo (1895), e quelli di Vogelius, che iniettava lo pneumococco dentro le cavità articolari.

Più fortunati furono nel 1897 Tournier e Courmont, che riuscirono finalmente a riprodurre l'artrite con iniezione endovenosa di pneumococchi e trauma articolare.

Finora però non era stata riprodotta un'artrite spontanea, senza trauma locale, come quella che ad esempio si sviluppa nel decorso di una polmonite: ebbene, furono Bezançon e Griffon che indicarono due modi di riprodurre l'artrite con la sola iniezione dei germi: per ciò basta fare un'iniezione di virus molto attenuato in un coniglio normale, oppure iniettare un germe virulento a conigli in via di immunizzazione. In ambedue le maniere l'artrite vien riprodotta spontaneamente e senza trauma locale. Gli AA. non dovettero però osservare le forme di artrite in tutto il loro svolgimento, e dicono come non si riproduca nel coniglio quella atrofia muscolare così caratte-

ristica per le artriti dell'uomo; forse ebbero troppa fretta nel sacrificare gli animali come si rileva dal loro stesso lavoro; essi non sanno infatti con certezza se gli animali possano sopravvivere perchè tutti furono uccisi in un periodo precoce.

Ora io posso affermare come l'atrofia muscolare sia una caratteristica dell'artrite sperimentale grave, ma che per questo bisogna attendere che i sintomi acuti declinino: è allora che durante parecchie settimane si stabilisce in un modo spiccatissimo. Ancora, l'artrite da pneumococco nel coniglio è sempre guaribile ed è solo questione di tempo più o meno lungo. Infine aggiungerò che oltre ai due modi insegnati da BEZANÇON e GRIFFON, ne esiste un terzo per riprodurre l'artrite sperimentale, e questo è di iniettare contemporaneamente, ad un coniglio normale, virus attivo e siero terapeutico in quantità appena capace di impedire la morte.

Varie ricerche furono eseguite da autori italiani e francesi sulle modalità di lesioni articolari: GABBI, MACAIGNE e CHIPAULT, FERNET e LORRAIN (citati da TOURNIER e COURMONT), BEZANÇON e GRIFFON se ne occuparono particolarmente; vi è discussione se l'artrite pneumococcica sia una artro-sinovite o non piuttosto una osteo-artrite. GABBI trovò solo lesioni sinoviali e MACAIGNE e CHIPAULT citano la seguente frase di CHANTEMESSE: « l'arthrite à pneumocoque n'est pas un'ostéo-arthrite, mais un'arthro-synovite ». D'altro lato gli ultimi AA. sopra citati sostengono la compartecipazione dell'osso.

Da ricerche anatomiche e istologiche da me compiute risulta quanto segue:

Nelle forme leggiere la tumefazione che si apprezza durante la vita dell'animale è soprattutto causata da edema, emorragie ed infiammazione dei tessuti periarticolari. Nell'interno dell'articolazione vi è un essudato vischioso, muco purulento ricchissimo di leucociti e di pneumococchi. La cartilagine ha perduto un po' della sua lucentezza, ma l'osso liberato dalle parti molli non è ingrossato, e segato pel lungo non mostra alterazioni interne.

Interessantissimo diventa l'esame delle lesioni nelle forme gravi che colpiscono l'articolazione del ginocchio: asportate

le parti molli, così l'estremità tibiale che quella femorale si mostrano ingrossate fino a 5 mm. in più dell'articolazione dell'altro lato presa per confronto. Aperta la capsula fuoresce liquido vischioso, che all'esame microscopico è costituito da leucociti, ma contiene pochi o punti germi: ciò dipende forse dal fatto che tali conigli furono sacrificati assai tardi dopo l'infezione e dopo il periodo acuto, per poter osservare la lesione ossea nelle sue maggiori manifestazioni.

In quattro casi che ho esaminati, le lesioni mantennero un tipo fisso: sui condili femorali sempre si presentarono ulcerazioni della cartilagine, bislunghe, a margini frastagliati, approfondantesi fino all'osso, che segato pel lungo mostrava, in corrispondenza dei punti ulcerati, ispessimento e ingrossamento delle trabecole. L'epifisi tibiale non mostrò mai ulcerazioni o perdite di sostanza nella cartilagine, che era soltanto poco lucida e di aspetto poroso. Sulla superficie di sezione dell'osso, la zona subcartilaginea era triplicata di spessore a confronto del normale e da essa si dipartiva un sistema trabecolare ricco e spesso. Fra le trabecole e subito al di sotto di esse il midollo era bianco-gialliccio, resistente al contatto e non molle come il vero midollo grasso.

Più interessanti ancora sono state le ricerche microscopiche eseguite decalcificando l'osso in acido nitrico diluito, sezionando al microtomo congelatore, oppure includendo in celloidina, e poscia colorando con ematossilina-eosina.

Le sezioni che comprendono i punti ulcerati dimostrano come la cartilagine sia completamente distrutta; l'osso si trova allo scoperto o al più è riparato da un sottile strato fibroso. Il passaggio fra parte ulcerata e non ulcerata è brusco, non graduale: la cartilagine finisce con capi arrotondati, coperti di tessuto fibroso, sui margini dell'ulcera. La cartilagine che ricopre il resto dell'articolazione non è normale: nei primi stadi o nei gradi lievi mostra un fibrillamento appena accennato della sostanza fondamentale, e si rinvengono capsule contenenti più cellule. Le alterazioni degli stadi avanzati sono cospicue: il fibrillamento è massimo, e fra i fasci di fibre si formano spazi canalicolari, nei quali non esiste mai infiltrazione parvicellulare. Ogni tanto si trovano zone necrotizzate e

sequestrate nello spessore della cartilagine. Le capsule sono per la maggior parte scomparse e le cellule, acapsulate, sono atrofiche, spesso con protoplasma vacuolizzato. Per i passaggi subìti dai pezzi non si è potuto stabilire se si tratti di vacuoli per degenerazione grassa. Accanto alle lesioni di ordine regressivo ve ne sono altre, ma più rare, di ordine irritativo, consistenti in proliferazione di cellule cartilaginee che dànno luogo a gruppi di cellule neoformate.

La reazione ossea avviene solo nei casi di artrite grave con ulcerazioni cartilaginee e consiste essenzialmente in un processo di osteite condensante.

La neoformazione ossea può avvenire per via diretta ed indiretta. Per via diretta si ha un meccanismo di produzione simile all'ossificazione normale, ossia per applicazione di catene di osteoblasti neoformati sulle trabecole ossee e susseguente formazione di nuove lamelle, che restringono via via gli spazi midollari dell'epifisi. Altrove gli osteoblasti si riuniscono in gruppi occupanti intere cavità midollari che occludono con la formazione di nuovo osso. Per via indiretta l'ossificazione ripete quanto succede nella formazione del callo osseo. Il midollo si converte in connettivo giovane che per secrezione di sostanza intercellulare dà luogo a cartilagine; questa viene poi sostituita da tessuto osteoide ed osseo. Giova infine notare che in certi casi il connettivo giovane formatosi nelle cavità midollari, invece di evolvere verso la cartilagine, dà luogo ad un connettivo adulto, ricco di fibre, che costituisce infine una fittissima rete, specie di cicatrice occludente una cavità midollare.

Ultimo particolare degno di nota è che il midollo delle epifisi artritiche è molto grasso e molto ricco di fibre connettivali, privo invece di elementi mielogeni. Esso contrasta col midollo intensamente funzionante della sottostante diafisi e delle altre ossa sane.

Lieve risentimento senza localizzazione del virus. — Con un trattamento presso a poco identico a quello usato pei conigli che hanno artrite, si può in alcuni casi osservare una sindrome lieve, non caratteristica, costituita da febbre e da diminuzione di peso o da uno solo di questi due sintomi.

Immunità. — Con dosi opportune di siero, si può in fine fare sì che il risentimento sia nullo, nè la temperatura nè il peso alterandosi; si è cioè ottenuta una sieroterapizzazione completa, una perfetta immunità passiva dell'animale che non è stato affatto sensibile al virus.

Fra la morte per setticemia acutissima e la completa immunità vi sono quindi varie forme di malattie intermedie, che hanno la caratteristica di colpire le sierose dalle più grandi alle più piccole: pericardio, pleura, peritoneo, meningi, sierose articolari. Il peritoneo e le sierose articolari sono le più facilmente affette.

Per ultimo è da notare che la divisione così schematica qui fatta in qualche caso non corrisponde alla realtà essendo colpite più parti; così ad es., non è raro che un coniglio con peritonite presenti lieve artrite, e qualche volta accade che negli ultimi momenti della peritonite i germi invadano il torrente sanguigno.

B) Studio morfologico del sangue.

Prima di esporre i risultati ottenuti studiando la formula leucocitaria dei conigli nelle varie forme di malattia pneumococcica, credo non siano superflue poche parole sul comportamento normale e sulla composizione di questa.

In primo luogo è da notare che è piuttosto difficile a stabilirsi, perchè esiste una notevole elasticità nei limiti fisiologici di essa.

Non è raro in varii conigli del tutto normali, o in uno stesso coniglio esaminando il sangue a più riprese, trovare formule con differenze notevoli. Una difficoltà tecnica è poi data dal fatto che i leucociti del coniglio, anche normale, hanno una certa tendenza ad aggrupparsi in cumuli, perdendo la nettezza dei confini protoplasmatici e nucleari, cosicchè ne diviene difficile il conteggio e la distinzione fra le varie specie. In condizioni patologiche, e precisamente nel caso dello pneumococco, questa tendenza è esagerata, cosicchè necessita fare gli strusciamenti con la massima abilità e prestezza, distendendo minime quantità di sangue su larghe superfici di vetro.

Alle difficoltà sopra accennate se ne aggiunge un'altra nei conigli infettati da pneumococco: e cioè la comparsa in circolo di elementi di probabile natura endoteliale, che rendono spesso ardua una distinzione fra essi ed i linfociti e mononucleati. Di tali cellule sarà fatta parola a suo luogo.

La formula leucocitaria del coniglio differisce essenzialmente da quella dell'uomo per la mancanza di neutrofili. Le cellule designate da varii AA. con tal nome sono in realtà cellule con granulazioni, che assumono la colorazione con l'eosina altrettanto bene che le cellule eosinofile umane. Soltanto nel coniglio vi sono due specie di cellule con granulazioni che assumono bene l'eosina: le une, che costituiscono il 30 % della totalità dei globuli bianchi, hanno granulazioni abbondanti, della grandezza di quelle eosinofile umane, di colorito rosso splendente; le altre, l'1 o 2 % della totalità dei globuli bianchi, hanno poche granulazioni, molto grosse, rotonde, d'un rosso più opaco delle precedenti. La differenza fra queste due specie di cellule è evidentissima, tale da non permettere esitazione nel classificarle; di più il loro comportamento di fronte agli stimoli patologici è diverso. Sono quindi essenzialmente due specie di cellule che meritano differente nome. Le ultime sono da tutti designate come *eosinofili* e tal nome sarà anche qui conservato; in quanto alle prime, dette impropriamente da alcuni *neutrofili*, saranno designate, seguendo la nomenclatura di altri AA., come *pseudo-eosinofili*, sebbene in realtà esse pure siano eosinofili.

In quanto al rapporto delle varie specie di leucociti fra loro, la caratteristica del sangue di coniglio è di abbondare di linfociti; mentre di questi nell'uomo se ne contano il 20-25 %, nel coniglio giungono fino quasi al 70 %. Inoltre il sangue di coniglio è più dell'umano ricco di cellule a granulazioni basofile o *mastzellen*. Dal confronto di moltissimi esami di sangue eseguiti in conigli normali, sono venuto a stabilire la seguente formula leucocitaria come tipo normale:

Polinucleati pseudo-eosinofili	25-35 %
» basofili (*mastzellen*)	2-10 »
» eosinofili	1-2 »
Linfociti	55-65 »
Mononucleati	2-4 »

Tale formula si accorda nella sua essenza con quelle ammesse già da altri AA. Dalla relativa elasticità delle cifre risulta come si debba tener conto solo delle variazioni rilevanti nel rapporto fra i varii tipi di leucociti.

La tecnica usata per la colorazione è stata sempre quella del May Grünwald: il conteggio fu esteso fra 200 e 300 globuli bianchi per ogni esame.

Lo studio della formula leucocitaria e della morfologia generale del sangue è stato diviso nei seguenti paragrafi:

1) Formula leucocitaria nella setticemia;

2) » » nella peritonite;

3) » » nell'artrite;

4) » » in seguito ad iniezione di filtrati o estratti;

5) Formula leucocitaria nell'immunità.

1) *Formula leucocitaria nella setticemia.* — Se contemporaneamente alla curva termica si studia, nei conigli iniettati con $^1/_{10}$ cc. di virus in circolo, il comportamento delle formule leucocitarie, vediamo che già alla 2ª ora dopo l'avvenuta infezione, quando comincia ad elevarsi la temperatura, il numero degli pseudo-eosinofili tende ad aumentare a discapito dei linfociti, ed alla quarta o sesta ora è avvenuta una vera inversione della formula leucocitaria, essendo gli pseudo-eosinofili saliti da circa 30 $^0/_0$ a 70-75 $^0/_0$ e più ancora, ed essendo proporzionalmente diminuito il numero dei linfociti (1). L'inversione della formula leucocitaria, una volta stabilita, si mantiene costante fino alla morte dell'animale, sia che la setticemia si svolga acutissima (15-20 h.) sia che si svolga in un tempo un po' maggiore (2-3 giorni).

Anche gli eosinofili vengono singolarmente influenzati dall'infezione; il loro numero diminuisce di molto o scompaiono del tutto tanto da non rinvenirne nessuno in conteggi di 300-400 leucociti. Meno influenzati sono i mononucleati ed i baso-

(1) L'aumento degli pseudo-eosinofili, e la diminuzione dei linfociti è un fatto di rapporto. Non è che i primi crescano a discapito dei secondi, ma bensì per effetto di una leucocitosi. In realtà sono gli pseudo-eosinofili che crescono mentre i linfociti restano nel loro numero normale per ogni mm^3. Ciò valga anche pel seguito del capitolo.

fili; pur tuttavia mentre i primi tendono un po' a diminuire i secondi aumentano alquanto.

Negli esami di sangue, specialmente delle forme che durano più a lungo, compaiono spesso degli elementi speciali, che non si osservano mai o solo raramente nei conigli normali, elementi che furono già in parte osservati da PANICHI, e che, accostandosi per certi caratteri alle cellule mononucleate del sangue, riesce spesso incerto se noverarle o no nel computo di queste, con notevole differenza della formula leucocitaria. Tali elementi si presentano sotto varie forme: ora sono globosi o bislunghi, con tendenza al contorno poliedrico e nucleo ovale, e qualche volta presentano colorazione del protoplasma più basofila di quella del nucleo; ora sono invece elementi con protoplasma identico a quello dei mononucleati, ma con due nuclei ben distinti e indipendenti fra loro; spesso si trovano poi elementi simili ai mononucleati, in preda ad una spiccatissima vacuolizzazione del plasma tutto; e finalmente si rinvengono assai frequentemente forme che somigliano del tutto a nuclei liberi, ipercolorati dal bleu di metile e granulosi (fig. 1: *a*, *b*, *c*, *d*).

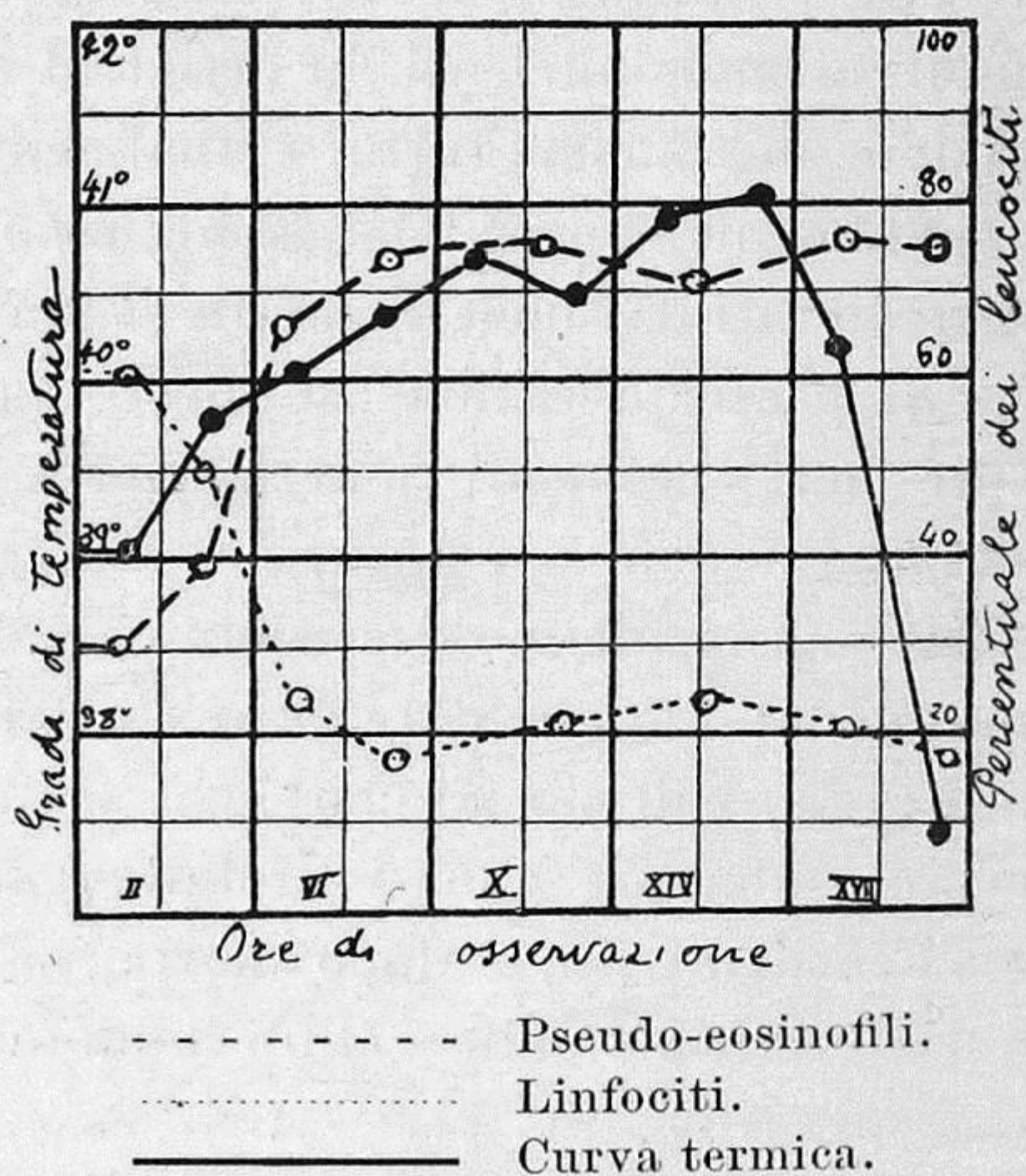
Sull'interpretazione di queste cellule che furono anche trovate nel sangue di conigli morti, quando gli altri elementi sanguigni non si coloravano più, già discusse PANICHI. Per parte mia io inclino a credere che essi non siano altro che cellule endoteliali sfaldate di fresco dai vasi sanguigni durante la infezione; e di ciò mi convinse sommamente un caso di setticemia subacuta che si prolungò per tre giorni: negli ultimi momenti di vita, e dopo morte, si rinvennero nel sangue di questo animale delle cellule endoteliali tipiche e in quantità considerevole (fig. 1: *e*, *f*); dà esse si passava poi per diversi gradi di transizione ad elementi del tutto simili a quelli sopra descritti.

Per quello che riguarda poi quegli elementi piccoli, colorati intensamente, che appaiono senza divisione fra nucleo e protoplasma, io credo con PANICHI che si tratti di nuclei isolati in degenerazione picnotica. Soltanto non credo di poterli riferire ai linfociti o ai mononucleati, ma penso piuttosto che anch'essi derivino dagli endoteli vasali, perchè generalmente compaiono assieme alle forme precedenti.

Tale interpretazione è suffragata da molti esempi riportati dal PATELLA nel suo lavoro per la dimostrazione della genesi endoteliale dei mononucleati. Leucociti mononucleati con plasma intensamente basofilo, cellule con protoplasma identico ai mononucleati e nucleo doppio, nuclei liberi si possono, come dimostra il PATELLA, trovare anche nel sangue normale, ma il loro numero cresce singolarmente nelle infezioni causate da un virus che colpisce gli endoteli vasali: questo è appunto il caso del virus pneumonico, il quale agisce proprio sull'intima come sarà dimostrato più sotto. Tutte queste forme e la degenerazione vacuolare furono già studiate negli ammalati di polmonite, e PATELLA stesso riporta degli splendidi fotogrammi, che somigliano esattamente agli elementi da me rinvenuti.

Nella setticemia i globuli rossi non presentano, morfologicamente, cambiamenti degni di nota. Costante è invece la presenza di scarse coppie di pneumococchi quasi sempre liberi, raramente fagocitate, e più numerose negli ultimi momenti di vita dell'animale.

Aggiungo ora una grafica che mostra a colpo d'occhio le variazioni principali della formula leucocitaria (pseudo-eosinofili e linfociti) in relazione al decorso della temperatura dell'animale.

- - - - - - - - Pseudo-eosinofili.
.... Linfociti.
———————— Curva termica.

2) *Formula leucocitaria nella peritonite.* — Nella malattia che si svolge con la peritonite, portando fatalmente alla morte dell'animale in pochi giorni, l'andamento della formula leucocitaria ha una caratteristica che quasi sempre si può rintracciare. Mentre cioè nella setticemia l'innalzamento degli pseudo-eosinofili, subito iniziatosi dopo la iniezione, accompagna l'animale fino alla morte, nella forma presente dopo un primo periodo d'innalzamento si ha una remissione; a questa succede

poi una nuova elevazione degli pseudo-eosinofili, che permane fino alla morte. Una sola volta il sangue di un coniglio, esaminato 15 ore avanti la morte, aveva formula linfocitica.

Il primo elevamento non è caratteristico come quello che si ha nella setticemia perchè in generale non si trovano quegli elementi ritenuti sopra come endoteliali; esso avviene assai presto, nelle prime 12 ore, e permane più a lungo, da 1 a 3 giorni; poi decresce e la formula torna presso a poco normale. Anche gli eosinofili, che per lo più scompaiono durante l'elevazione degli pseudo-eosinofili, tornano presenti appena questa scompare. Un periodo di remissione della curva pseudo-eosinofilica è quasi sempre presente e ben manifesta. Di raro è poco accennato, ma anche in tali casi è evidente la tendenza al rialzo dei linfociti.

Col ritorno della formula leucocitaria allo schema normale non coincide però il benessere dell'animale: la temperatura resta elevata, anzi spesso sale ancora; il peso diminuisce e le condizioni generali deperiscono. Presto l'esame del sangue mostra qualche elemento endoteliale, sebbene ciò si avveri con molto più scarsità che nella setticemia: tuttavia questo è l'indice che il virus sta vincendo le resistenze organiche ed attacca le pareti dei vasi. Più tardi comincia di nuovo ad alterarsi la formula: mononucleati e linfociti si riducono sempre più di numero e finalmente cedono il campo agli pseudo-eosinofili che sorpassano nuovamente il numero dei primi: la fine è allora prossima e l'animale muore quasi sempre in un progressivo aumento dei leucociti pseudo-eosinofili.

Clinicamente Patella ha osservato lo stesso fenomeno: basandosi su parecchie osservazioni di polmonitici, è venuto alla conclusione che una riduzione molto forte delle cellule mononucleate è sempre indizio di malattia grave e forse letale; la prognosi è tanto più favorevole quanto meno la formula mononucleare si allontana dal normale: al 4° giorno di malattia il 3-4 % soltanto di cellule mononucleate sarebbe indizio funesto.

Nè a questo si limitano le alterazioni ematiche: quando la malattia dura assai a lungo (8-10 giorni), negli ultimi tempi, e precisamente allorquando si ha di nuovo la comparsa di molti

pseudo-eosinofili nel sangue, si trovano assai spesso dei globuli rossi nucleati che si fanno più abbondanti man mano che la malattia progredisce; a questi si aggiungono poi dei globuli bianchi con un solo nucleo, protoplasma leggermente basofilo, e sparse in esso poche granulazioni rosse e bleu: questi elementi si potrebbero definire come mononucleati con granulazioni (fig. 1: *g*, *h*). Ma se granulazioni dei mononucleati sono state descritte da varii AA., queste si mettono in evidenza solo con mezzi coloranti speciali: così ad es., le granulazioni bleu di Wolf e Michaelis dimostrate col methilen-azur che si forma nel liquido di Michaelis, o le granulazioni rosso-rubino di Pappenheim rilevate col liquido di Pappenheim. Qui si tratta invece di granulazioni in tutto simili alle pseudo-eosinofile ed alle basofile, e tingibili col May Grünwald; per questo io propendo piuttosto a considerarle come elementi mielogeni molto giovani.

Disgraziatamente la scarsità eccessiva di questi elementi non ha consentito di studiarli di fronte ad agenti chimici e fisici per determinare se si trattasse veramente di granulazioni comuni o no.

I polinucleati pseudo-eosinofili e basofili presentano essi pure delle particolarità: i loro nuclei non sono così ben distinti come normalmente, ma si mostrano confluenti e scolorati; le granulazioni sono più pallide, poco nette, scarse, e non assumono la colorazione caratteristicamente. Miste alle granulazioni pseudo-eosinofile sono spesso granulazioni bleu, differenti tuttavia per tono di colore e per le più piccole dimensioni da quelle veramente basofile (fig. 1 : *i*).

Tutti questi fatti uniti parlano senz'altro in favore della presenza di una reazione midollare: mentre il primo riversarsi degli pseudo-eosinofili in circolo può esser considerato come una semplice leucocitosi, comparsa in seguito allo stimolo apportato dal germe o dai suoi prodotti (essa si ottiene infatti con semplice filtrato ed è presente anche nei conigli immunizzati non più attaccabili dal virus) ed in tutto paragonabile alla neutrofilia che si osserva nell'uomo nel decorso di varie infezioni acute; la seconda pseudo-eosinofilia è invece un fenomeno differente e per i caratteri che assumono le varie cellule, e più

di tutto per esser accompagnata da elementi che solo possono intervenire per una reazione midollare.

Le alterazioni e la scarsità delle granulazioni nei polinucleati, la poca evoluzione del nucleo, i leucociti policromatofili, e più di tutto i globuli rossi nucleati e gli elementi considerati come mielociti, sono altrettante prove confermanti questo asserto. Nè può destar meraviglia una reazione midollare se si pensi che le infezioni da pneumococco sono fortemente anemizzanti, e la curva dell'emoglobina decresce gradatamente e caratteristicamente lungo tutto il decorso della malattia (Panichi).

La presenza di granulazioni tingibili in bleu nei leucociti pseudo-eosinofili e nei mononucleati è stata interpretata in modo particolare da Pane, il quale ammise che esse stessero a significare una distruzione di pneumococchi per parte del midollo osseo, milza e sangue. Che le granulazioni osservate dal Pane siano quelle stesse da me osservate lo dimostra la descrizione che l'A. ne fa, e più ancora i suoi disegni. Si tratta di granulazioni irregolari, più piccole di uno pneumococco, intensamente colorabili, sparse; esse sono per lo più contenute nei polinucleati ma anche in cellule mononucleate, e ciò specialmente subito dopo la morte; di più compaiono nelle forme durate un po' a lungo, e si trovano massimamente dopo 5-6 giorni dall'iniezione del virus. Il Pane dimostra sperimentalmente che queste granulazioni non sono eguali a quelle delle *mastzellen* perchè hanno diverso comportamento di fronte agli agenti fisici e chimici, e ai coloranti. Avendo infine trovato alcune di queste granulazioni simili a pneumococchi, egli crede che le granulazioni stesse non siano altro che avanzi di germi.

Io non divido su questo punto l'opinione del Pane. Va bene che tali granulazioni non siano identificabili con le vere basofile: di ciò sono anch'io convinto per quelle contenute negli pseudo-eosinofili, e nessuno ha ancora dimostrato leucociti che contengano più d'una delle tre qualità di granulazioni che secondo Ehrlich formano la specificità dei polinucleati. Quando in casi di leucemia o altra malattia si trovano cellule policromatofile, si può sempre dimostrare che si tratta di granulazioni speciali miste ad una delle tre specie fonda-

mentali neutrofile, acidofile e basofile. Così adunque l'aver dimostrato che non si tratta di granulazioni basofile non esclude ancora che si tratti di altre granulazioni.

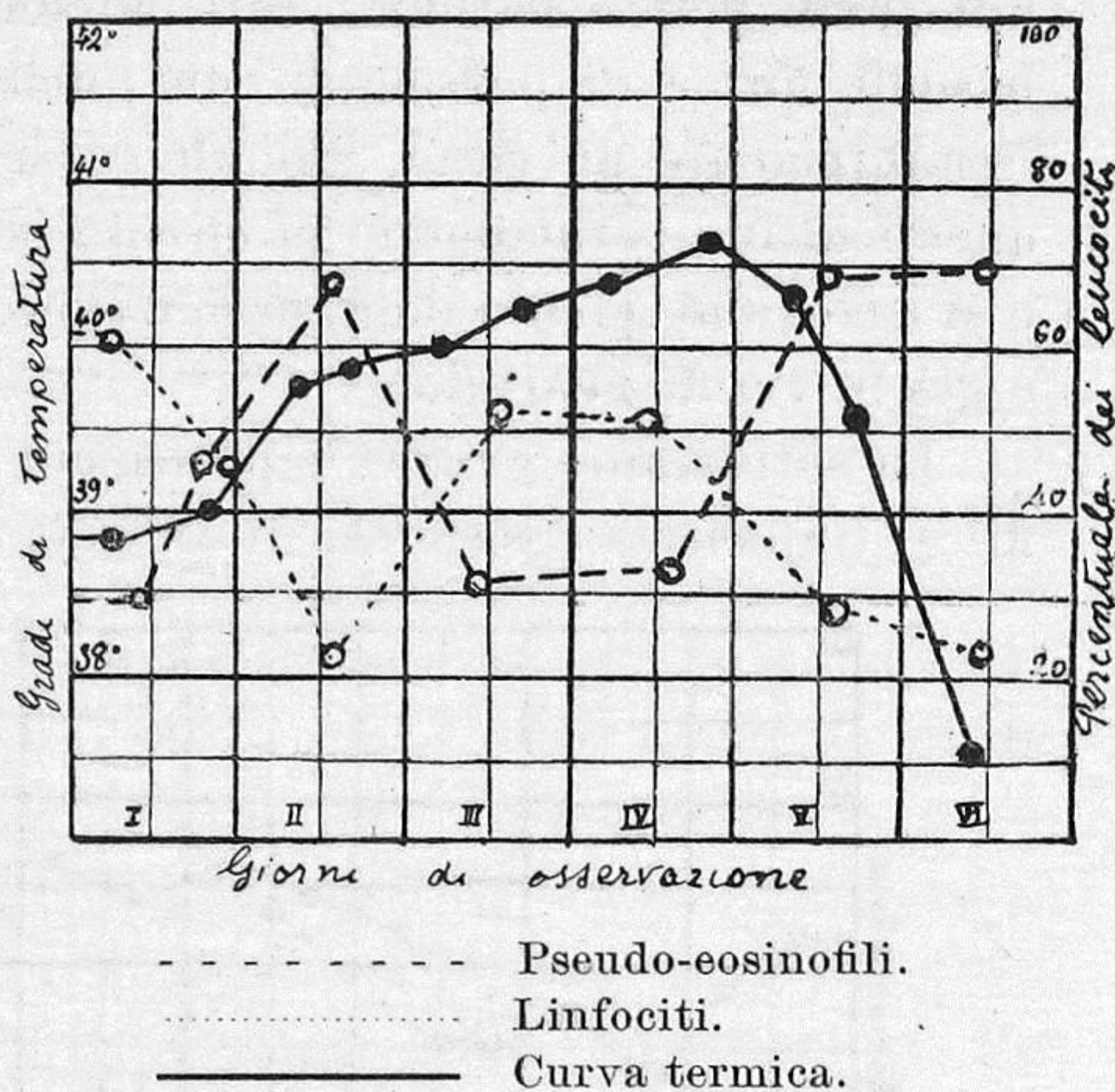
D'altra parte è da osservare che i cocchi, e lo pneumococco in particolare, non vanno incontro, quando sono fagocitati, ad uno spezzamento in frammenti che si colorano intensamente. Avviene invece quanto si osserva in culture molto vecchie e morte: si ha un rigonfiamento più o meno accentuato nei varii germi, cosicchè le coppie o le catenelle non sono più costituite da elementi eguali, ma variamente ingranditi e scolorati al centro. Il Pane stesso dice di non aver trovato nella letteratura osservazioni simili alla sua, neanche negli studi sulla fagocitosi di Metschnikoff e la sua scuola. Infine per parte mia non ho mai trovato forme di passaggio convincenti fra queste granulazioni e gli pneumococchi caratteristici; la fagocitosi dello pneumococco virulento, com'è noto è difficile; tuttavia, nei casi in cui l'ho rinvenuta, trovai soltanto coppie indubbie e perfino fornite di capsula.

Prima di chiudere questo paragrafo, resta ancora a far parola di uno speciale reperto fornito dal sangue di due conigli poco avanti la morte avvenuta per peritonite. Essi erano stati iniettati con $^1/_{10}$ cc. di virus e una dose insufficiente di siero (l'uno con siero di laboratorio, l'altro con siero della casa Merck). Si tratta dell'esistenza in circolo di leucociti pseudoeosinofili e di altre cellule nelle quali più non è distinguibile il nucleo dal protoplasma, probabilmente grossissimi linfociti presenti nel circolo di questi due animali, contenenti globuli rossi fagocitati. Tali elementi scarsissimi nel 2° caso, erano oltremodo abbondanti nel 1°, e se ne trovavano di quelli che avevano fagocitato fino a cinque globuli rossi. Che di vere fagocitosi si trattasse era dimostrato dal fatto che tali globuli rossi erano innicchiati in un vacuolo protoplasmatico dei globuli bianchi. Due volte fu osservata contemporanea fagocitosi di globuli rossi e pneumococchi. I globuli rossi fagocitati erano più o meno coloriti, e per diverse gradazioni si andava dal colorito rameico, che usualmente assumono nella colorazione al May Grünwald, fino alla scolorazione quasi completa. Le cellule fagocitarie mostravano nel loro protoplasma vacuoli rotondi e

vuoti, riproducenti le forme e le dimensioni di un globulo rosso (fig. 1 : *l*, *m*, *n*, *o*, *p*).

Tali cellule globulifere abbondantissime nella milza, scoperte nel 1865 da Bizzozero nel midollo delle ossa di varii malati e di conigli sani, furono poi rinvenute anche negli essudati peritonitici e nel pus degli ascessi; ma nella libera circolazione, per quanto abbia consultato la letteratura, il solo reperto che abbia trovato è quello di Tizzoni e Fileti in animali smilzati.

Credo quindi opportuno di insistere particolarmente su questa curiosa e rara osservazione, forse indice di insufficienza splenica, perchè ambedue i conigli in questione presentavano oltre alla peritonite un tumor di milza simile a quello dei conigli setticemici, ed avevano anche pneumococchi nel sangue. Trattavasi quindi di una forma di peritonite associata con la setticemia, ciò che causò la speciale condizione di produrre lesioni notevoli della milza in una malattia durata più a lungo che la setticemia pura.

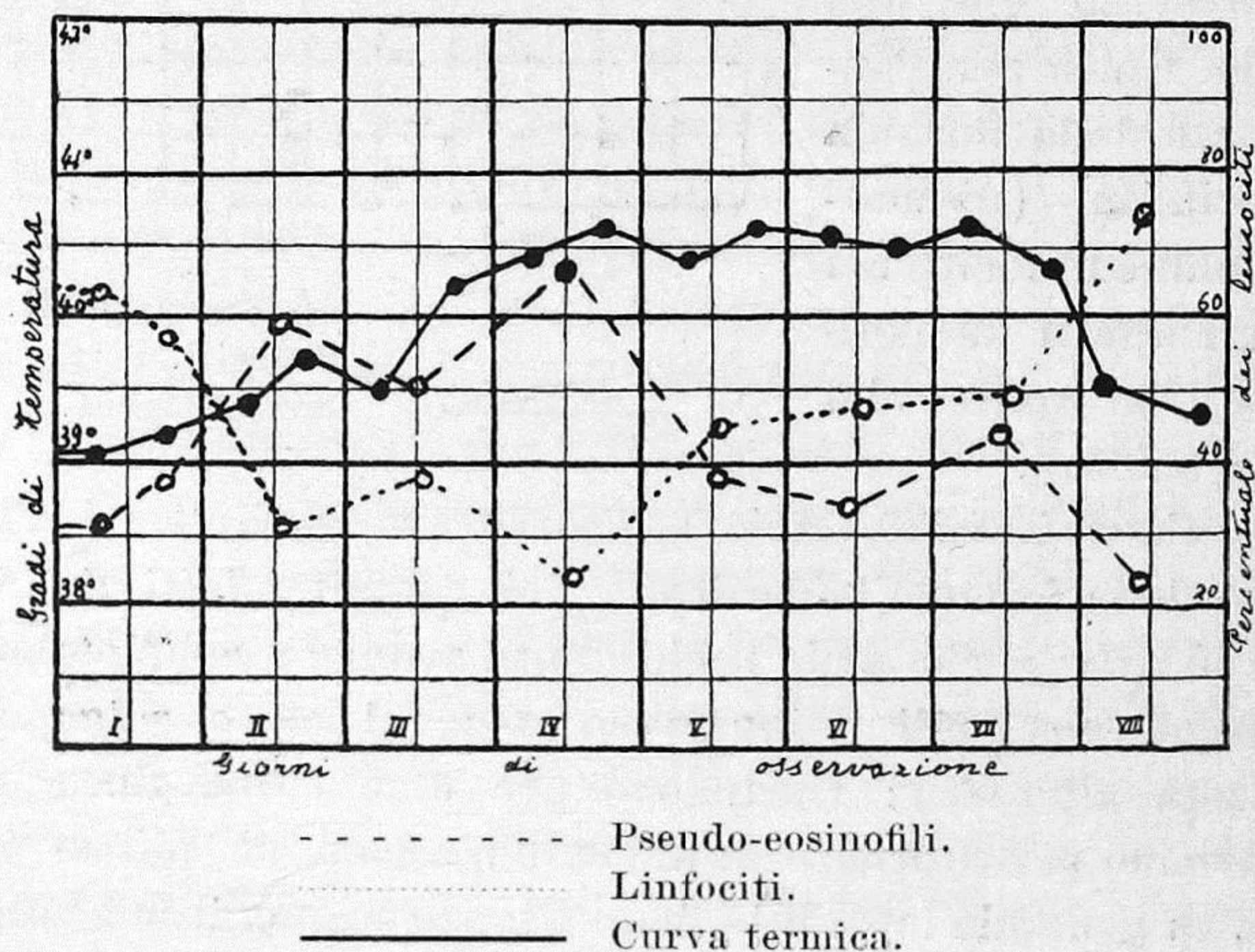
Presento ora una grafica tipica per l'andamento della formula leucocitaria (pseudo-eosinofili e linfociti) nei conigli affetti da peritonite, di fronte alla curva termica.

3) *Formula leucocitaria nell'artrite.* — Semplice è l'andamento della formula leucocitaria nei conigli affetti da forma lieve di artrite, che dopo pochi giorni svanisce completamente: gli pseudo-eosinofili si innalzano come al solito, salgono alla consueta altezza, vi rimangono per uno o due giorni e poi decrescono per ritornare al numero normale, nè più si innalzano. In generale la caduta degli pseudo-eosinofili non coincide

con il cessare dello zoppicamento dell'animale nè con la defervescenza; ma avviene in un periodo anteriore, quando ancora l'animale ha febbre e continua a mostrarsi ammalato. Gli eosinofili hanno pure il consueto comportamento; diminuiscono con il diminuire dei linfociti, e tornano ad alzarsi assieme a questi.

Dubbie modificazioni avvengono a carico dei basofili e mononucleati grandi.

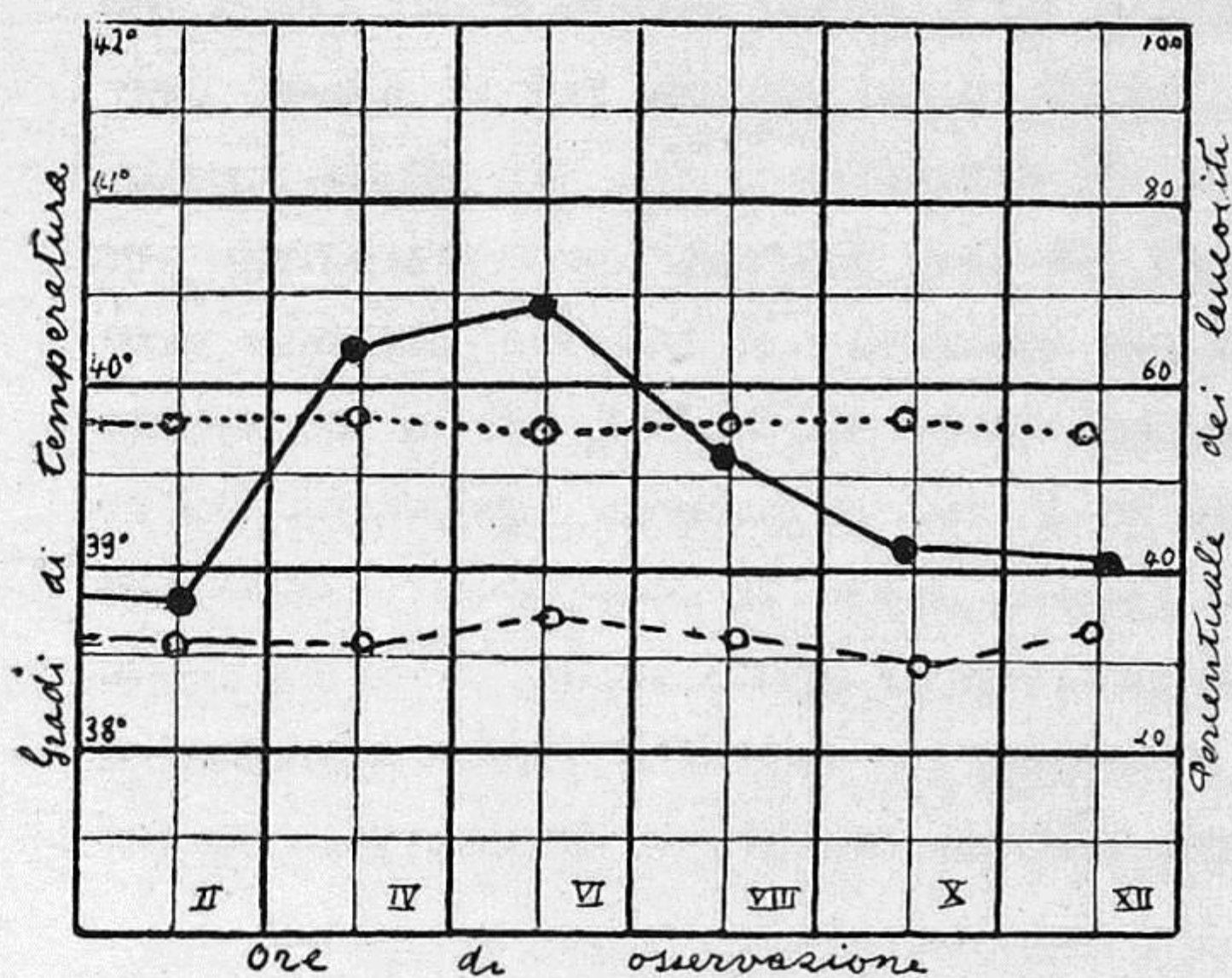
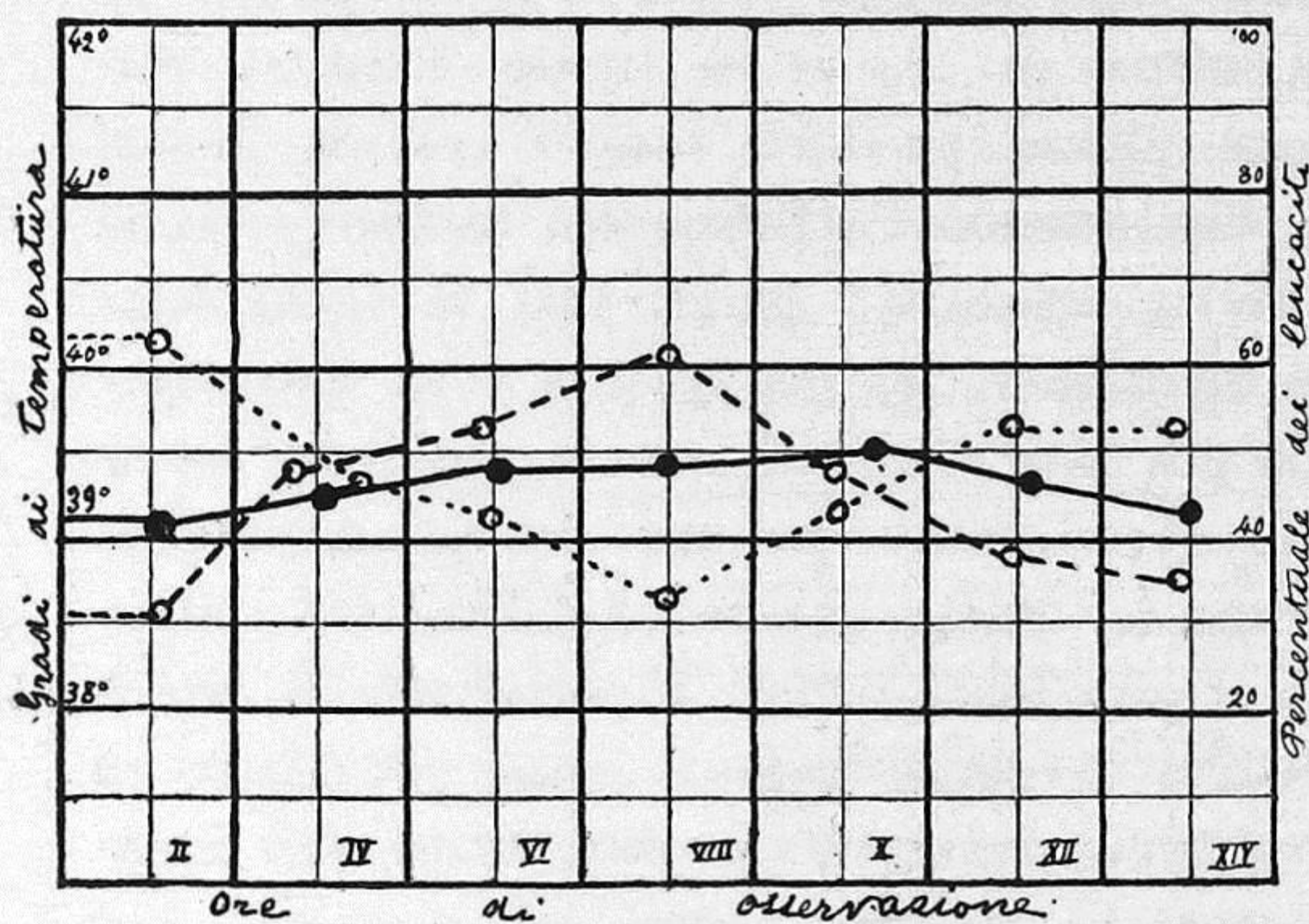
Diversamente procedono le cose in quei casi gravi di artrite che durano parecchie settimane portando ad una forte atrofia del treno posteriore; in questi la pseudo-eosinofilia dura parecchi giorni, e quando decresce, ciò avviene gradatamente, non rapidamente. Di più dopo i primi giorni di malattia cominciano a comparire nel sangue le forme descritte nel paragrafo precedente, che denotano reazione midollare; e cioè: cellule a granulazioni policromatofile, rari mielociti pseudo-eosinofili e basofili, forme di passaggio con nucleo molto evoluto, e, più costantemente di tutto, globuli rossi nucleati. Specialmente questi ultimi permangono in circolo per un tempo assai lungo, e si ritrovano ancora dopo la defervescenza e quando l'animale è già in via di guarigione.

La sottostante grafica rappresenta la curva pseudo-eosinofilica, linfocitica e termica, di un caso di media gravità.

- - - - - - - - Pseudo-eosinofili.
.... Linfociti.
———— Curva termica.

4) *Formula leucocitaria in seguito ad iniezione di filtrati o estratti.* — Dieci cc. di cultura giovine, di 18 h., del nostro pneumococco, coltivato in brodo TIZZONI, venivano centrifugati lungamente ad alta velocità (3500-4000 giri al minuto) fino ad avere la completa sedimentazione di tutti i germi; il liquido soprastante veniva decantato, ed i germi sedimentati venivano ripresi con acqua salata, lavati in tal mezzo, poi di nuovo centrifugati e ripresi in 10 cc. di soluzione 1 $^0/_{00}$ di idrato potassico, messi in agitatore per 48 ore, lasciati in termostato per altrettanto tempo, filtrati per candela; il liquido limpido così ottenuto veniva essiccato nel vuoto su H_2SO_4 ed al momento di adoperarlo era disciolto in 2 cc. di acqua distillata. Altre volte l'estratto dei germi veniva fatto in soluzione fisiologica anzichè in potassa, ma si procedeva egualmente. Nell'un modo o nell'altro si otteneva insomma un estratto che essiccato si conservava indefinitamente fino al momento di usarlo, conservando le sue proprietà.

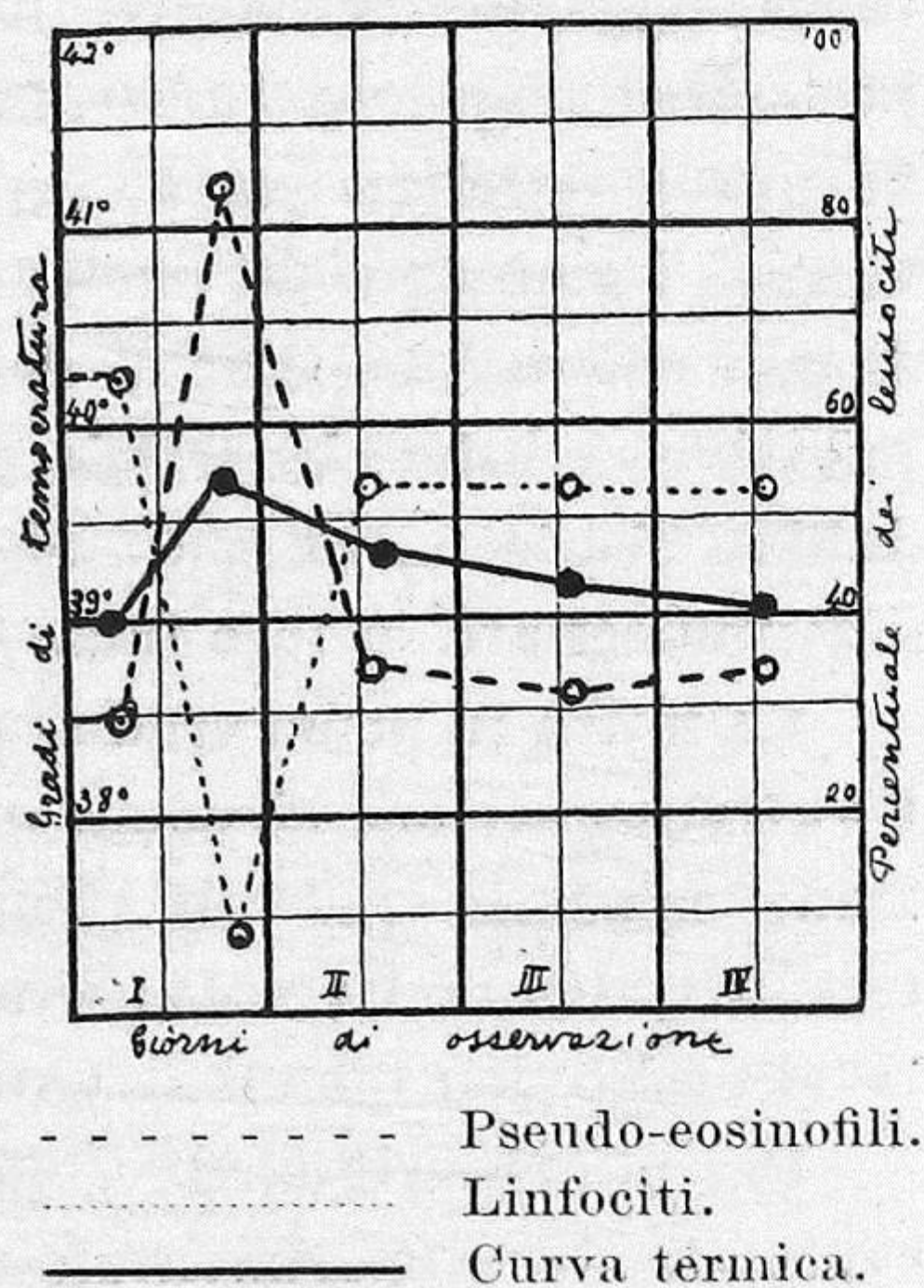
I filtrati di cultura erano ottenuti molto semplicemente filtrando per candela culture di 18 ore in brodo TIZZONI. Siccome nella filtrazione alcuni prodotti tossici restano fissati alla candela stessa, diminuendo l'attività del liquido, così in principio volli provare a separare i germi con la centrifugazione anzichè con la filtrazione. Ma per quanto essa fosse prolungata e spinta alle più alte velocità, non fu possibile escludere la presenza dei germi, tanto che uno dei primi animali iniettati morì di peritonite. Fatto questo che dimostra l'altissima virulenza dello stipite usato in tali esperimenti; e invero un numero piccolissimo di germi poteva esser contenuto in questi liquidi due volte centrifugati, che non lasciavano dimostrare gli pneumococchi in ripetuti esami microscopici. Per questo ho sempre preferito la filtrazione per candela, con il qual modo, se anche si scapitava un po' nella tossicità, c'era poi la sicurezza della sterilità del mezzo. La quantità di filtrato iniettata fu sempre di 10 cc. ridotti a 2 cc. per evaporazione nel vuoto su acido solforico.

Iniettando parallelamente varîi conigli con estratto potassico, estratto cloruro-sodico e filtrato, apparve anzitutto manifesto che i due estratti agiscono presso a poco nel modo

identico. La differenza apparve invece nel confronto fra gli estratti ed il filtrato. Nell'uno e nell'altro caso non si ottenne una vera malattia del coniglio; ma seguendo gli animali nel modo di comportarsi della temperatura e della formula leucocitaria, si vide che mentre il filtrato produceva di preferenza un innalzamento della curva termica, gli estratti tendevano piuttosto a produrre la solita inversione della formula leucocitaria, con innalzamento degli pseudo-eosinofili e diminuzione dei linfociti; tali modificazioni duravano solo breve tempo (12-24 h.) e qualche volta acquistavano un carattere tipico, schematico. Presento qui la grafica di un caso iniettato con filtrato, nel quale la formula leucocitaria restò completamente immodificata, mentre vi fu notevole elevazione termica, e quella d'un altro coniglio iniettato con estratto potassico, nel quale senza elevazione termica avvenne la completa inversione della formula leucocitaria; fatto questo che fa pensare come le sostanze pirogene siano contenute nel liquido di cultura, mentre quelle che agiscono sulla formula leucocitaria siano in prevalenza endobacteriche.

- - - - - - - - Pseudo-eosinofili.
.... Linfociti.
———— Curva termica.

5) *Formula leucocitaria nei conigli immunizzati.* — Nei conigli che da lungo tempo sono trattati con forti dosi di virus, così da poter sopportare fino ad 1 $^1/_2$ cc. di cultura giovine in brodo Tizzoni senza risentirne danno, si trovano circolanti anche a distanza dall'iniezione dei globuli rossi nucleati. La formula leucocitaria fra una iniezione e l'altra è normale, e solo a volte abbondano gli eosinofili. Ad ogni nuova iniezione di virus fatta a tempo opportuno l'animale non sembra risentire nulla, e solo qualche volta si rileva col termometro un modico aumento di temperatura. Seguendo la formula leucocitaria, si nota come all'iniezione segua un rapido innalzamento degli pseudo-eosinofili con diminuzione degli eosinofili e linfociti. Tale inversione della formula leucocitaria dura soltanto 24 ore all'incirca, dopo di che scompare del tutto. L'aumento degli pseudo-eosinofili raggiunge in alcuni casi un'altezza rilevante, maggiore che in qualunque affezione pneumococcica, e non è raro il caso che salga fino all'85 $^0/_0$ della totalità dei leucociti: tutti gli elementi sono ben conservati e non mostrano particolarità alcuna. I globuli rossi nucleati non hanno un comportamento caratteristico, tanto che mentre in alcuni casi si vedono scomparire o diminuire dopo l'iniezione, in altri aumentano; una volta comparvero nel giorno seguente all'iniezione in quantità così grande da non passar quasi campo microscopico senza rinvenirne. Nei conigli in trattamento di immunizzazione attiva vi è quindi una continua reazione midollare che a volte viene vieppiù eccitata dalla nuova iniezione del virus. Nei conigli completamente sieroterapizzati si ha un comportamento della curva leucocitaria simile a quello dei conigli immunizzati attivamente. Non vi sono mai globuli rossi nucleati.

- - - - - - - - Pseudo-eosinofili.
.... Linfociti.
———— Curva termica.

Presento una grafica molto caratteristica sul comportamento della formula leucocitaria nei conigli immunizzati attivamente.

Concludendo, ecco quanto risulta dal complesso di queste osservazioni:

L'iniezione del virus, o del virus misto a siero, produce sempre, anche nei conigli altamente immunizzati, un tipico aumento degli pseudo-eosinofili, che non è in rapporto alcuno nè con la gravità della malattia, nè con la curva termica.

Nelle forme gravi di malattia, specialmente nella setticemia, compaiono in circolo elementi di natura endoteliale, dovuti a lesione dei vasi.

Nelle forme di malattia che durano un certo tempo (peritonite, artrite grave) compaiono in circolo globuli rossi nucleati, e forme mielocitiche, indizio di reazione midollare.

Nei conigli in corso di immunizzazione attiva sono quasi sempre presenti globuli rossi nucleati, segno di grande attività midollare.

Le sostanze tossiche che agiscono sulle modificazioni della formula leucocitaria sono prevalentemente endobacteriche.

C) Studio istologico del midollo osseo, della milza, dei vasi sanguigni.

Uno studio istologico del midollo osseo, della milza e dei vasi negli animali trattati con virus pneumococcico fu sopra tutto suggerito dell'esame morfologico del sangue esposto nel precedente capitolo. Infatti la presenza di elementi di manifesta natura endoteliale parlava in favore d'una lesione dell'intima vasale; i globuli rossi nucleati e i mielociti erano indizio sicuro di una compartecipazione del midollo delle ossa al processo infettivo; e infine le cellule globulifere in circolo destavano il dubbio che la milza e il midollo delle ossa fossero insufficienti a disimpegnare la loro funzione emocateretica.

La milza fu bensì studiata già nel 1887 da FOÀ e BORDONI-UFFREDUZZI; ma siccome questi non usarono alcune colorazioni speciali per gli elementi linfoidi (MAY GRÜNWALD, GIEMSA, UNNA-PAPPENHEIM), ho creduto opportuno ripetere le ricerche con questi attuali mezzi d'indagine.

Per ciò che riguarda il midollo osseo nulla ho trovato che sia stato fatto sperimentalmente; soltanto in individui morti

di polmonite SCHUR e LOEWY e WOLOWNIK trovarono grande abbondanza di linfociti.

Anche le lesioni vasali sono state studiate soltanto su cadaveri di pneumonici, e per opera di MASSALONGO, BARRAUD, MATTIROLO, SCHMALTZ, WIESEL fu riconosciuta una lesione dell'intima.

Oltre a questi citati argomenti, altri due spinsero allo studio istologico presente. L'uno è rappresentato dall'osservazione di M. WASSERMANN, che svelò come il midollo osseo sia il principale luogo di formazione degli anticorpi pneumonici. L'altro è dato dalle emorragie multiple che sempre si ritrovano nelle forme setticemiche e qualche volta nella peritonite pneumococcica. Ciò valse a confermare ancor più l'idea di un legame molto intimo esistente fra lo svolgersi dell'infezione pneumonica e queste parti.

Lo studio fu eseguito per quelle forme di malattia le quali additavano particolarmente le lesioni dei suddetti organi (setticemia e peritonite) ed esteso anche ai conigli immunizzati, presentando questi animali globuli rossi nucleati in libera circolazione.

La tecnica e le colorazioni usate furono le seguenti: pel midollo osseo e milza colorazione di strusciamenti, con MAY GRÜNWALD o GIEMSA; colorazione di sezioni fissate in formolo, con MAY GRÜNWALD e GIEMSA uniti secondo la tecnica indicata in nota (1); colorazione di sezioni fissate in alcool sublimato, col GIEMSA; colorazione di sezioni fissate in alcool o in FOÀ, con il metodo di UNNA-PAPPENHEIM; colorazione di sezioni fissate in formolo o ZENKER, con ematossilina ed eosina; colorazione di sezioni col metodo di WEIGERTH per la fibrina.

Pei vasi furono usate le fissazioni in MÜLLER, MÜLLER-formolo, formolo, e le colorazioni col Sudan III e con ematossilina-eosina.

---

(1) Il metodo di colorazione unito con MAY GRÜNWALD e GIEMSA consiste nel fissare in formolo, disidratare, passare in cloroformio, includere in paraffina, sezionare a 4-5 μ., e colorare le sezioni attaccate su vetrino per 30' con MAY GRÜNWALD, e per 2 ore a 37° in GIEMSA (una goccia per 1 cc. di acqua). Poscia si differenzia in acqua acidulata con a. acetico (IV goccie in 50 cc. H_2O), si disidrata rapidamente, si rischiara e si morta in balsamo (vedi *Bibliografia*, WERZBERG).

1) Conigli morti per setticemia.

Il midollo osseo di questi animali è sede di importanti lesioni, alcune delle quali riguardanti il reciproco rapporto degli elementi componenti, altre sono alterazioni vasali e interstiziali, altre ancora colpiscono le cellule proprie del midollo.

Per ciò che riguarda il rapporto degli elementi lo studio è reso agevole dagli strusciamenti e più dalle sezioni colorate con May Grünwald e Giemsa. Queste dimostrano come tali midolli contengano solo scarsissimi pseudo-eosinofili a confronto del normale, mentre vi è esuberanza di cellule linfocitiche, ciò che fu notato da Schur e Loewy e da Wolownik in morti di polmonite. Confrontando questo con quanto avviene nel sangue (spiccata pseudo-eosinofilia) si direbbe che il midollo si è spremuto di questi elementi per riversarli in circolo. Poco è a dirsi riguardo agli eosinofili e alle *mastzellen*. I globuli rossi sono abbondantissimi. Già con questi metodi si notano lesioni cellulari consistenti in disfacimento delle cellule a granulazioni ed emogeneizzazione delle mononucleate. Si nota inoltre, in molti casi, la presenza di cellule pseudo-eosinofile contenenti granulazioni bluastre miste alle rosse. Su queste cellule che si ritrovano in circolo nelle forme più lunghe di malattia (peritonite) fu già discusso nel precedente capitolo.

I preparati allestiti con questo metodo dimostrano poi un altro fatto importante: la presenza di numerosissimi pneumococchi sparsi ovunque fra le cellule midollari, specialmente attorno ai vasi, e mai fagocitati.

Col metodo di Unna-Pappenheim nulla si rileva a causa delle gravi alterazioni.

Per le lesioni di ordine vascolare e interstiziale servirono soprattutto sezioni fissate in formolo e colorate con ematossina-eosina, nel qual modo si ha una mirabile differenziazione. Il fatto più grossolano che colpisce esaminando a piccolo ingrandimento è la presenza di emorragie molto estese che infiltrano il tessuto midollare per largo raggio. Evidente è pure la presenza di un fondo esteso fra i varii elementi, disposto a zone, che si colora in rosa con eosina, omogeneo a piccolo, zolloso

a forte ingrandimento, dovuto probabilmente ad albumina coagulata, giacchè non assume la colorazione della fibrina.

Su preparati fissati in ZENKER e FOÀ e colorati lentamente con ematossilina al cloralio ed eosina fu agevole lo studio delle alterazioni cellulari. Sono soprattutto le cellule mononucleate che mostrano i segni di una lesione degenerativa, necrotica, a carico specialmente dei nuclei, e che può rivestire due tipi differenti fra loro collegati per una graduale serie di passaggi.

Nell'un tipo il protoplasma è pallido e disfatto; il nucleo, pure scolorato, ha risolto il reticolo cromatico in frantumi irregolari, che si riuniscono sulla membrana esilissima, lasciando la parte centrale incolora. Talora i frantumi cromatici sono così scarsi e piccoli che il nucleo sembra una vescica vuota; raramente la membrana è rotta e i frantumi sparsi pel protoplasma.

Nell'altro tipo il protoplasma resta colorato, ma è disposto a zolle irregolari; il nucleo, ipercolorato, si solca dapprima di varie linee di frattura che si incrociano al centro; poi i varii frammenti si allontanano e prendono forma di goccie, cosicchè la cellula viene infine a prendere l'aspetto di un'area zollosa sparsa irregolarmente di goccie cromatiche cupe, unico residuo del nucleo.

Il primo tipo di lesione si trova più spesso nelle forme acutissime; il secondo in quelle a decorso un po' più lento. Cosicchè si può pensare che la prima forma rappresenti un genere di morte cellulare più rapido della seconda.

Lesioni sul tipo di quelle sopra descritte, ma in grado molto più lieve, presentano le cellule a nucleo gemmante.

Alterazioni ancora più notevoli sono nella milza, la quale, come il midollo, è carica di pneumococchi quasi delimitati alla polpa e solo scarsamente invadenti il follicolo.

I globuli rossi sono abbondantissimi; mancano quelli nucleati, come mancano mielociti; scarseggiano leucociti con granulazioni. Non furono osservate plasmacellule a causa delle alterazioni.

Queste milze sono caratterizzate da una speciale forma di lesione vascolare: sul fondo grigio della polpa splenica, quasi tutta necrotizzata, spiccano i follicoli vivamente colorati perchè

infarciti da enorme quantità di globuli rossi. Gli elementi proprii del follicolo sono scissi dalle emazie, ma il rapporto fra queste e quelli non è ovunque lo stesso: in alcuni punti i linfociti sono regolarmente sparsi qua e là fra i globuli rossi; altrove riuniti a gruppetti scissi da colonne di emazie ammassate. Nel primo caso è probabile si tratti di fortissima iperemia, nel secondo è evidente l'emorragia.

Colorando col metodo per la fibrina si mette poi in evidenza una ricchissima rete, specialmente spiccata nelle milze di animali morti in 2-3 giorni. Questa rete, più o meno finemente ordita a seconda dei punti, è limitata alla polpa. I follicoli ne son circondati del tutto, ma nel loro interno penetra tutto al più qualche ramo che non oltrepassa la loro zona periferica; così essi rimangono scolorati in mezzo alla vivace colorazione circostante.

Le lesioni cellulari sono gravissime nella polpa; gli elementi proprii sono scarsi, pallidi, come vesciche vuote; i pochi che assumono ancora la colorazione hanno il nucleo in cariolisi; la forma, la disposizione, la quantità sono ovunque alterate, e fra gli elementi ancora riconoscibili è sparso un detrito formato di cellule disfatte, avanzi di cromatina, granulazioni di leucociti. Anche i globuli rossi della polpa sono mal conservati. In quanto agli elementi residui dei follicoli, presentano per lo più un'alterazione consistente in opacità e omogeneità del nucleo e protoplasma, che sono ancora distinguibili l'uno dall'altro solo per la diversa intensità di colorazione.

Tutti i fatti osservati su queste milze mi sembrano potersi ricollegare: mancando una circolazione vasale chiusa della polpa splenica, gli elementi di questa si trovano a diretto contatto con i germi ed i veleni circolanti, onde si produce la necrosi e la rete fibrinosa. Di qui un tumor di milza duro che ostacola la libera circolazione follicolare cagionando iperemia, stasi, emorragie e le conseguenti alterazioni degli elementi follicolari.

E passiamo ai vasi: come materiale di studio furono adoperati tratti di grosse arterie (aorta mesenterica, carotidi) ed il grande omento che si presta molto bene per lo studio delle piccole arterie e vene nonchè dei capillari; questo, subito fissato

appena aperto l'addome, veniva poi steso su vetrini e opportunamente colorato.

In colorazioni col Sudan III risultò nei grossi vasi, e specialmente nell'aorta, una degenerazione grassa degli endoteli, intensa in alcuni tratti, nulla in altri. Quando molte cellule endoteliali vicine sono colpite, nella sezione le goccie si dispongono in file molto lunghe che hanno l'apparenza di corone da rosario. Non si rilevano alterazioni nucleari che sono ovunque ben conservate, nè lesioni della media.

Nell'omento le arteriuzze son più rispettate, mentre le lesioni maggiori sono nelle venuzze e nei capillari, disposte anche qui a zone, e così di natura regressiva come progressiva; infatti a lato di endoteli degenerati in grasso, altri se ne trovano con cellule contenenti più nuclei.

Nell'interno di alcune piccole vene e capillari si notò, in un coniglio morto per setticemia in 50 ore, la presenza di cellule a nucleo per lo più rotondo, a volte ovoidale, con protoplasma abbondante e ripieno di goccioline di grasso. Tali cellule, certamente contenute nell'interno dei vasi e commiste alle emazie, erano limitate ad alcune regioni. La loro apparenza era di cellule endoteliali sfaldate; soltanto alcune si accostavano piuttosto ai leucociti sudanofili. È probabile che si trattasse veramente di endoteli sfaldati e degenerati, pel fatto che si trovavano solo a regioni e solo nei capillari e piccole vene, ossia là dove più specialmente si notano le alterazioni vasali.

Le lesioni vasali sono poi fortissime nella milza e midollo, dove si possono trovare endoteli necrotizzati.

2) Conigli morti per peritonite.

I midolli ossei di animali morti per questa forma non contengono pneumococchi, trovandosi questi strettamente localizzati nel focolaio peritonitico, e non passando in circolo o negli altri organi.

Al pari dei midolli degli animali morti per setticemia, anche questi contengono molte cellule linfocitiche e pochissime pseudo-eosinofile, con scarse granulazioni e quasi tutte mielocitiche.

Le lesioni circolatorie consistono in una spiccata congestione midollare, ma al contrario dei midolli setticemici non vi sono emorragie, o, se esistono, sono scarse e limitatissime.

Le lesioni cellulari, notevoli nella setticemia, sono lievi in questa forma, e consistono in qualche cariolisi sparsa e lieve. Ma in generale gli elementi sono ben conservati. Spiccata è invece la tendenza del midollo alla reazione: specialmente alla periferia dell'organo si notano cariocinesi, scissioni dirette e globuli rossi con due o tre nuclei.

La milza al pari del midollo non è invasa dagli pneumococchi. Contiene abbondantemente leucociti con granulazioni e anche globuli rossi nucleati, dovuti probabilmente ad un risveglio della funzione ematopoietica, tanto più che i conigli adoperati erano piuttosto giovani (1200-1400 gr.). Ciò non può sembrare strano poichè nei conigli giovanissimi (1000 gr. e meno) globuli rossi nucleati si trovano normalmente. Si potrebbe pensare che questi globuli fossero stati portati qui dal sangue, perchè in queste forme è comune trovarne in circolo. Ma è poco probabile, perchè nei conigli adulti (2000-3000 gr.) in corso di immunizzazione, nei quali esistono sempre globuli rossi nucleati nel circolo, mancano nella milza. Tali globuli non sono mai fagocitati.

Nulla a carico delle cellule plasmatiche.

Nella polpa splenica esistono, sparse ovunque, delle zone granulose irregolari che si tingono in rosa coll'eosina e contengono filamenti di fibrina; credo di poterle identificare con i trombi delle lacune venose già descritti da Foà e Bordoni-Uffreduzzi nella stessa infezione. Attorno ad esse i globuli rossi sono abbondanti.

Gli elementi della polpa e dei follicoli sono in perfetto stato di conservazione; soltanto scarseggiano nella polpa lasciando vedere lo stroma dell'organo.

Nei conigli morti di peritonite lo studio dei vasi, a causa delle alterazioni peritoneali, non potè esser eseguito sull'omento. Fu quindi limitato alle grosse arterie ed ai vasi osservati nelle sezioni di milza e midollo. Le lesioni sono poco rilevanti, ciò che già poteva esser dedotto dalla scarsità di elementi endoteliali nel sangue e di emorragie, e consistono in modica

degenerazione grassa di alcune cellule endoteliali dell'intima arteriosa e venosa; gli elementi colpiti sono scarsi.

3) Conigli immunizzati.

Le particolarità descritte in questo paragrafo sono proprie anche dei conigli guariti di artrite, i quali dopo tale affezione sono in realtà sulla via dell'immunizzazione.

Al contrario dei conigli morti per setticemia e peritonite, il midollo osseo di questi animali sani, opportunamente sacrificati, si mostra ricchissimo di pseudo-eosinofili e povero di linfociti (fig. 2). Esaminando i midolli di questi animali in tempi variamente distanti dall'ultima iniezione di virus, risulta che subito dopo l'iniezione gli pseudo-eosinofili decrescono fino a scendere sotto la norma, poi salgono a un massimo (7°-10° giorno), quindi scendono col tempo al normale. Del pari abbondanti sono i globuli rossi nucleati e i mielociti così da dare a questi midolli l'aspetto di organi in grande attività funzionale.

Osservazione di sommo interesse fu il rinvenire nel midollo di alcuni conigli immunizzati lo pneumococco disposto in coppie caratteristiche.

Quattro conigli immunizzati altamente furono l'oggetto di questa osservazione: uno era stato sacrificato 2 giorni dopo l'ultima iniezione del virus; il 2° dopo 7; il 3° dopo 12; il 4° dopo 18. Nel 1° i germi erano scarsi, isolati, non tipici; nel 2° in numero fortissimo, sommamente caratteristici, a coppie, a catenelle, a vere colonie frammiste alle cellule midollari e quasi sempre in vicinanza degli spazi del grasso, mai fagocitati (fig. 2); nel 3° pure caratteristici ma molto più scarsi; nel 4° scarsissimi e atipici.

L'importanza di questa osservazione è manifesta: si ripete per lo pneumococco quanto già è notissimo pel b. tifico. Mentre l'organismo è saturo di anticorpi capaci di neutralizzare quantità enormi di virus e di tossine, e si potrebbe credere che questi venissero senz'altro distrutti, ecco invece i germi che si ritrovano negli organi ematopoietici in abbondanza, forse in riproduzione. Essi non vengono fagocitati, e d'altro lato non provocano lesioni cellulari o reazione; nè si possono considerare

quali corpi inerti, poichè contro corpi inerti si eccita almeno la fagocitosi; se ne vivono invece come in simbiosi con l'organismo e solo col tempo verranno eliminati.

La presente osservazione porta una esauriente spiegazione ai fatti osservati da TIZZONI e PANICHI sulla lunga permanenza degli pneumococchi nella circolazione dei conigli immunizzati e di individui guariti di polmonite. Gli organi ematopoietici funzionano come depositi, dai quali si ha un lento passaggio di germi in circolo.

La conservazione di tutti gli elementi midollari è perfetta.

Parimenti interessante fu in questi conigli lo studio della milza, giacchè nel 2° e 3° coniglio (vedi sopra) abbondanti erano anche qui gli pneumococchi, riuniti a grandi gruppi, localizzati nella polpa e frammisti alle cellule spleniche. Anche nella milza non osservai sicure fagocitosi, ma l'escluderle senz'altro è molto difficile perchè i grossi fagociti contengono goccie cromatiche di ogni dimensione e spesso con disposizione tale che potrebbero essere scambiate per coppie di pneumococchi un po' rigonfiati. Questi fagociti sono in numero fortissimo, molto superiore al normale, e lo studio della funzione emocateretica della milza in questi conigli è importante: il lavorìo di distruzione è così intenso che si trovano enormi cellule fagocitiche ridotte a veri magazzini contenenti emazie pallide, resti di leucociti a granulazioni, pigmento ematico e goccie cromatiche di ogni dimensione.

Il rapporto fra i varii elementi della milza è normale, nè presentano alterazioni morfologiche.

Nessuna alterazione fu riscontrata a carico dei vasi.

Dallo studio istologico del midollo delle ossa, milza e vasi, si possono trarre le seguenti conclusioni:

Le lesioni morfologiche degli elementi cellulari sono massimamente rilevanti nella setticemia, nel caso cioè nel quale il germe circolante arriva a contatto diretto di queste varie parti. Lesioni più lievi e rivestenti particolari caratteri si trovano pure nella morte per peritonite.

Nelle setticemie le lesioni consistono: in emorragie e cariolisi spiccatissime nel midollo delle ossa; in necrosi della polpa splenica con susseguente congestione ed emorragie dei follicoli

i cui elementi sono omogeneizzati; in spiccata degenerazione grassa e sfaldamento degli endoteli vasali.

Nella peritonite vi è: gran congestione midollare con rare cariolisi; trombosi delle lacune venose della milza; lieve degenerazione grassa degli endoteli vasali.

Tanto nell'una che nell'altra forma il midollo è ricco di cellule mononucleate, poverissimo di pseudo-eosinofili. Nelle milze di animali morti per peritonite vi sono globuli rossi nucleati.

Nella setticemia il midollo, la milza e il sangue dei cadaveri sono invasi da pneumococco, mentre ciò non avviene nella peritonite.

I midolli di conigli in corso di immunizzazione presentano subito dopo ogni singola iniezione una diminuzione di pseudoeosinofili, mentre in seguito ne presentano una grande abbondanza. Sono pure ricchi di globuli rossi. Le milze dimostrano un accresciuto potere emocateretico.

Fatto di massima importanza è la presenza, nei midolli e nelle milze di animali immunizzati, degli pneumococchi anche a distanza dall'ultima iniezione. Tali germi sono in coppie caratteristiche, riuniti in colonie, non fagocitati. Non provocano reazione infiammatoria di difesa.

D) Considerazioni generali sulla immunità antipneumococcica sperimentale.

Il modo col quale si stabilisce nel coniglio l'immunità sperimentale attiva e passiva appare evidente se si esaminano le varie forme di malattia ottenute con una sieroterapizzazione a diversi gradi, di fronte ai reperti istologici ed anatomo-patologici descritti nei precedenti capitoli.

Un germe virulento, iniettato in circolo da solo o con quantità del tutto insufficiente di siero terapeutico, causa, come abbiamo veduto, una setticemia mortale in un termine variabile da 15-20 ore a 2-3 giorni: in questo caso lesioni importantissime e germi in grandissima quantità si ritrovano nel sangue, nei vasi, nella milza, nel midollo osseo, mentre altri organi sono esenti da lesioni specifiche. È quindi evidente che un

germe virulento possiede un'azione elettiva sul sistema circolatorio ed ematopoietico, ed è a questi sistemi che si limitano le lesioni caratteristiche.

Se invece lo pneumococco virulento si inietta in circolo contemporaneamente ad una quantità di siero terapeutico appena insufficiente a salvare l'animale, oppure se lo pneumococco virulento si inietta ad un animale lievissimamente immunizzato (trattamento con filtrato di cultura o estratti di germi), si osserva che il sistema ematopoietico non è più la parte prediletta del germe, ma che invece sono colpite le grandi sierose, pericardio, pleura e peritoneo; soprattutto però il peritoneo, sì che la peritonite fibrinosa può considerarsi come la seconda forma di malattia; ed è quindi nell'essudato fibrino purulento che si trovano abbondantissimi gli pneumococchi, capsulati, mentre tutti gli altri organi ed i liquidi organici, siero di sangue compreso, ne sono privi.

Il germe virulento iniettato contemporaneamente ad una dose di siero capace di impedire una malattia mortale, oppure l'iniezione di quantità molto forte di virus ad un animale in corso di immunizzazione attiva, esplica la sua azione elettivamente sulle piccole sierose, dando l'artrite e qualche volta la borsite periarticolare. Durante la malattia lo pneumococco si trova localizzato là mentre le rimanenti parti dell'organismo ne restano libere.

Infine l'iniezione di virus non produce alcuna malattia o localizzazione morbosa, dopo una sieroterapia completa o nei conigli altamente immunizzati.

Di somma importanza è il fatto che nei conigli immunizzati il virus non viene distrutto: anche a distanza dall'iniezione si ritrovano fra le cellule spleniche e midollari tipiche coppie di pneumococchi, che vivono in rapporti del tutto speciali con l'organismo perchè non lo danneggiano e d'altro lato non provocano nè fagocitosi nè altra reazione. Questa osservazione spiega poi come nei conigli immunizzati ed in individui guariti di polmonite si possa dimostrare batteriologicamente, per lungo tempo dopo l'infezione, lo pneumococco (TIZZONI e PANICHI).

La scala delle varie affezioni sopra esposte: setticemia, peritonite, artrite (che sono le tre forme principali di malattia)

dimostra evidentemente una varia sensibilità, o meglio un comportamento diverso, di queste varie parti. La spiegazione del modo di evolvere dell'immunità pneumococcica si può intravedere bastantemente.

M. WASSERMANN, avendo studiato la formazione degli anticorpi pneumococcici nelle varie parti dell'organismo, trovò come gli estratti del midollo osseo fossero più di tutti gli altri organi e più del siero del sangue atti a sieroterapizzare contro lo pneumococco; mentre, ad es., il siero di sangue aveva una potenza tale che ne occorreva 0,8-1 cc. per salvare un animale iniettato con 400 dosi mortali di virus, bastava per raggiungere lo stesso scopo 0,2 cc. di estratto di midollo. Anche gli organi linfoidi hanno un'azione simile a quella del midollo, sebbene minore. Il potere immunizzante del midollo delle ossa si inizia prestissimo, già al 3° o 4° giorno dopo l'iniezione del virus e prima che compaia nel siero di sangue; fatto questo che dimostra come proprio in esso avvenga la produzione di anticorpi specifici, e che messo in rapporto alle forti lesioni osservate in quest'organo nella setticemia acquista un alto significato: dimostra cioè che quella parte dell'organismo che più di tutto è sensibile all'azione del virus, è altresì la prima a reagire con formazione di anticorpi: onde, a condizione che la malattia non sia rapidamente mortale e duri un tempo sufficientemente lungo per permettere la reazione immunitaria, diventa la più resistente.

Basta infatti iniettare una dose piccolissima di virus, o un virus meno potente, o fare l'introduzione del virus per una via meno diretta di quella circolatoria, perchè, prolungandosi il tempo di incubazione, il sistema ematopoietico reagisca e sia salvo contro l'infezione.

WASSERMANN osservò che già al 3° o 4° giorno vi è formazione di anticorpi nel midollo osseo: e l'osservazione di WASSERMANN coincide col fatto che la morte per setticemia pura avviene sempre dentro i primi tre giorni dall'infezione, dopo il qual termine se l'animale muore è per un'affezione delle grandi sierose.

Iniettando virus e siero terapeutico avviene presso a poco come iniettando virus attenuato, virus scarso o altro: il siero

paralizza nei primi giorni l'azione dei germi sia perchè esso abbia una elezione per il sistema ematopoietico ed ivi si fissi, o sia perchè neutralizzi i prodotti dei germi; frattanto gli organi in questione hanno il tempo di reagire con la formazione di anticorpi e diventano insensibili; l'azione del virus si esplica allora sulle parti immediatamente più recettive e cioè sulle grandi sierose, specialmente sul peritoneo. Con tutta probabilità esse pure sono legate intimamente nel processo d'immunità, ma la reazione loro avviene più tardi di quella del midollo e degli organi linfoidi, cosicchè posson essere colpite da un germe che per le sue qualità di virulenza, o pel modo col quale è stato introdotto, vinca le naturali resistenze dell'organismo solo dopochè il midollo e gli organi linfoidi sono rimasti immunizzati.

Finalmente se anche le grandi sierose hanno avuto il tempo di reagire prima che il germe esplichi la sua azione virulenta, allora vengono colpite le piccole sierose, che bisogna ritenere come le più tarde a reagire, non solo, ma anche come quelle parti che più difficilmente di tutte possono presentare una immunità sia attiva che passiva; cosicchè quando già da tempo tutti gli altri sistemi hanno acquisito un'altissima resistenza specifica, esse stanno ancora là a dimostrare un punto debole, vulnerabile, che lo pneumococco può ancora aggredire. Ed è questo lo scoglio principale contro il quale tutti i sieri antipneumococcici urtano sperimentalmente. Questi sieri in generale spiegano un'azione molto valida contro la setticemia e la peritonite pneumococcica salvando la vita dell'animale; ma quando si pretende che oltre dalla morte un siero salvi anche dalle manifestazioni artritiche, quella dose bastevole per fare scampare l'animale deve essere di molto accresciuta, spesso quadruplicata.

*
* *

Ecco infine i principali fatti messi in luce dal presente lavoro:

Coll'iniezione contemporanea del virus in quantità mortale e siero terapeutico in dosi opportune si può ottenere una scala

di affezioni di decrescente gravità fino alla immunità (setticemia, peritonite, mielite, artrite, immunità). L'immunizzazione delle varie parti dell'organismo avviene in modo direttamente proporzionale alla sensibilità di esse al virus, cosicchè gli organi più sensibili sono anche i primi a diventare resistenti.

Il sangue, il midollo delle ossa, gli organi linfoidi sono le parti che giuocano la massima importanza nell'infezione e nell'immunità; primi ad ammalarsi sono anche i primi ad immunizzarsi attivamente e passivamente. Poi vengono in ordine di importanza le grandi sierose, quindi le piccole.

Tutte le speciali forme suaccennate sono accompagnate da una reazione leucocitaria, consistente sul principio in una intensa eosinofilia. In seguito si hanno modificazioni morfologiche del sangue che caratterizzano ciascuna forma: così nella setticemia si trovano in circolo elementi di natura endoteliale e coppie di germi; nella peritonite la pseudo-eosinofilia iniziale spesso cessa e ricompare nel periodo premortale; circolano inoltre globuli rossi nucleati ed elementi mielocitici. Nell'artrite pure, se la malattia dura a lungo, la pseudo-eosinofilia cade e circolano elementi di reazione midollare. Nei conigli in corso di immunizzazione si trovano sempre globuli rossi nucleati, e spesso in quantità sorprendente.

Del pari ad ognuna delle forme di malattia o di immunità suddette corrispondono lesioni differenti del midollo osseo, milza e vasi. Nella setticemia le lesioni midollari consistono in scarsità di pseudo-eosinofili, in emorragie estese ed abbondanti necrosi cellulari; poi necrosi della polpa splenica, che è sede di sviluppata rete fibrinosa, ed emorragie dei follicoli, gli elementi dei quali sono omogeneizzati; in speciale degenerazione grassa e sfaldamento degli endoteli vasali; il sangue, il midollo, la milza sono invasi dallo pneumococco. Nella peritonite v'è nel midollo scarsità di pseudo-eosinofili, congestione, rare cariolisi con spiccata tendenza alla riproduzione (cariocinesi); trombosi nelle lacune venose della milza e presenza in questa di globuli rossi nucleati; lievi lesioni degenerative negli endoteli vasali; queste varie parti non sono invase dallo pneumococco che resta localizzato nel focolaio peritonitico. I midolli dei conigli in corso di immunizzazione presentano grande

abbondanza di pseudo-eosinofili e sono in grande attività funzionale; la milza è sede di accresciuto potere emocateretico. Un fatto di massima importanza è costituito dalla presenza degli pneumococchi nella milza e midollo di questi animali immunizzati, ciò che illumina le osservazioni di Tizzoni e Panichi sulla persistenza del germe nel circolo degli animali trattati con esso e degli individui guariti di polmonite; è ovvio come lo pneumococco annidato in questi organi venga lentamente riversato in circolo.

NOTA. — Essendo la parte sperimentale del presente lavoro già terminata, furono pubblicate da Joseph Koch nel *Zeitschrift f. Hyg.*, vol. LXIX, pag. 437, delle ricerche sulla localizzazione dei germi nel midollo osseo. In bambini che ebbero a sopportare infezioni varie, ed in conigli infettati con streptococchi, pneumococchi e carbonchio, l'A. trovò i rispettivi germi nel midollo epifisario.

Questo reperto collima perfettamente con quanto è stato esposto in un capitolo del presente lavoro.

Bologna, dicembre 1911.

Spiegazione delle figure della Tavola IV.

Fig. 1. — Ingrandimento 1050. Colorazione con May Grünwald.
a, b, c; elementi di probabile natura endoteliale.
d; elemento in picnosi.
e, f; cellule endoteliali.
g, h; elementi interpretati come mielociti.
i; pseudo-eosinofilo con granulazioni bleu.
l, m, n, o; fagocitosi di globuli rossi in circolo.
p; fagocitosi contemporanea di globuli rossi e pneumococco.

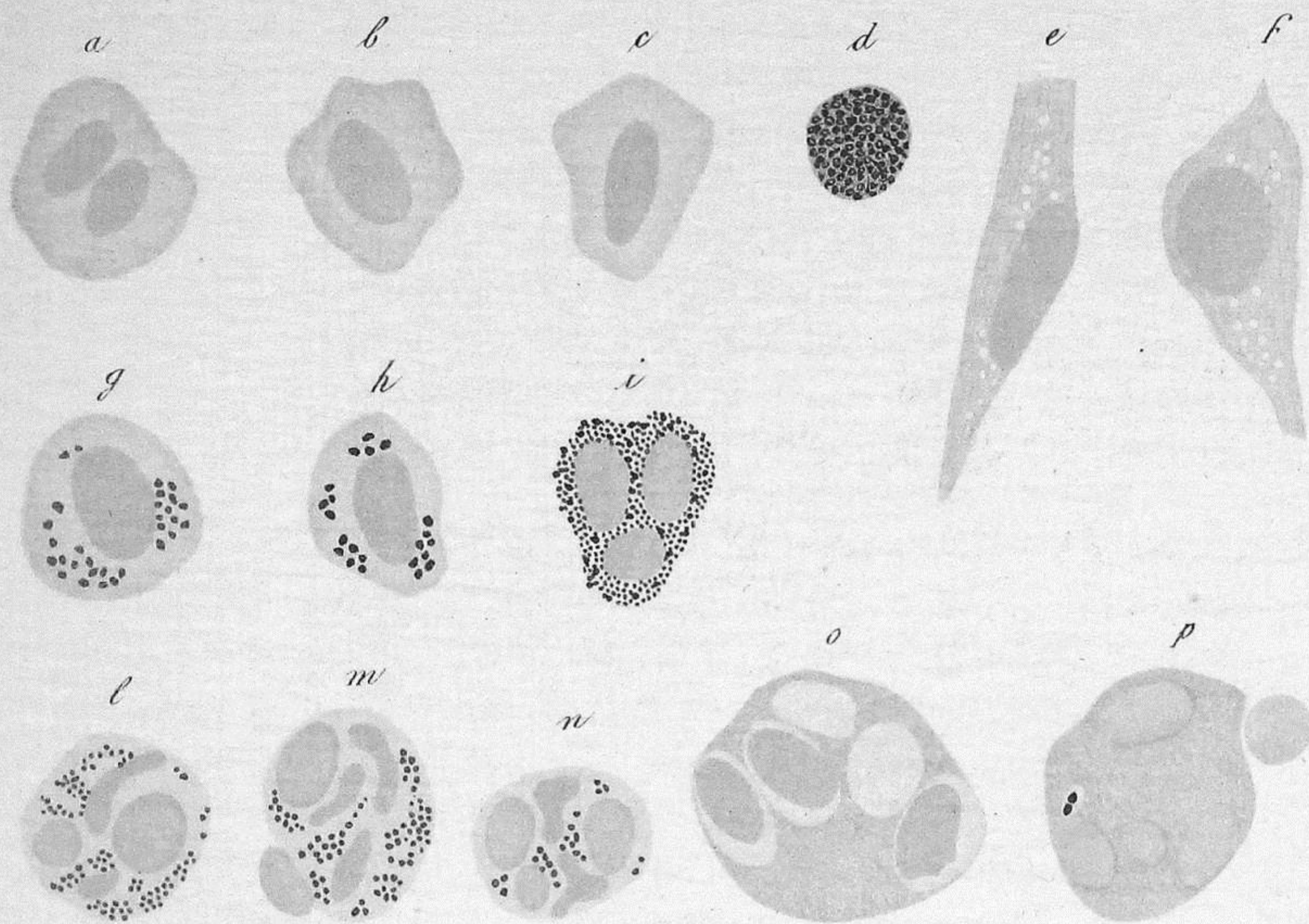
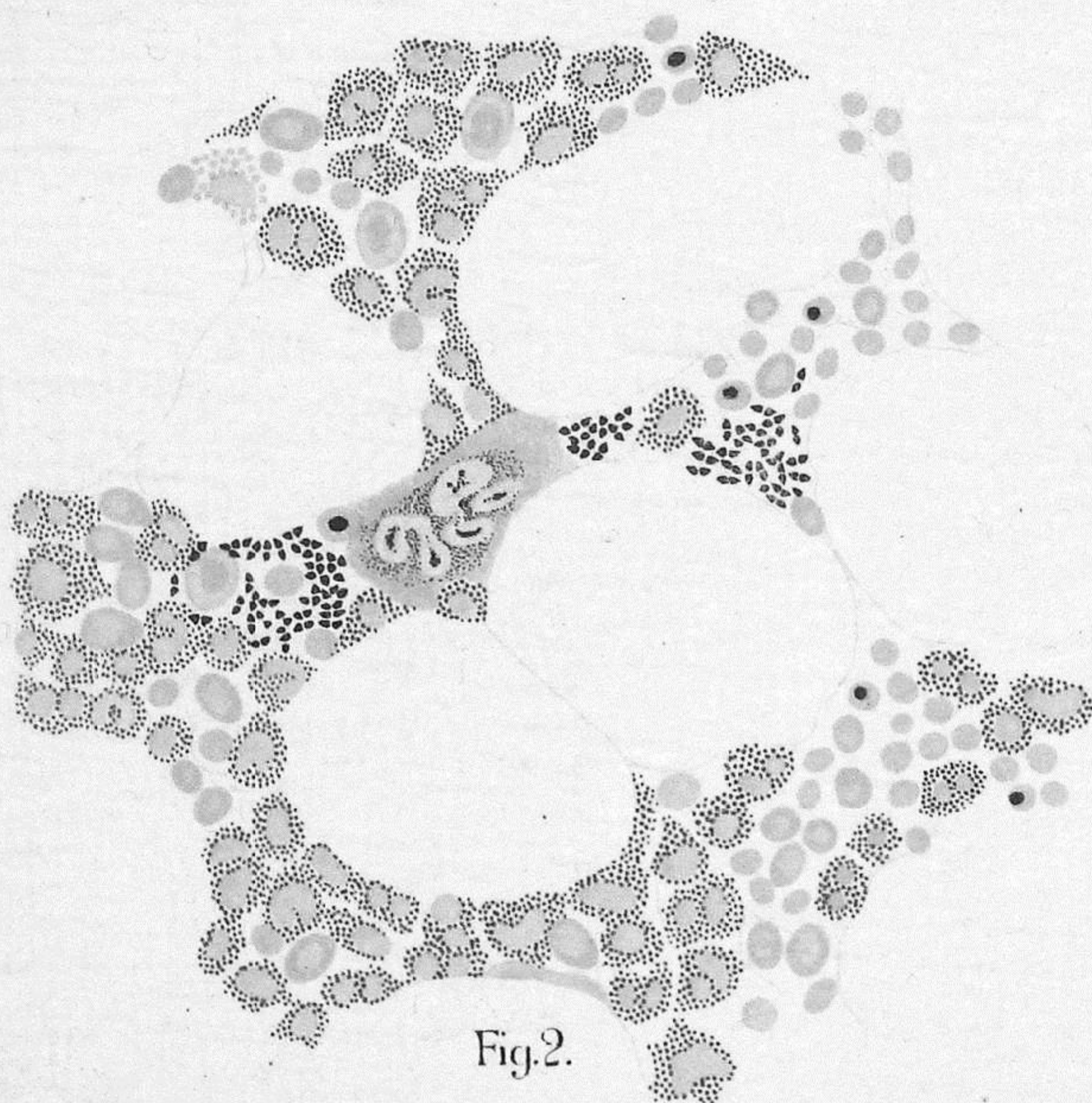
Fig. 2. — Ingrandimento 525. Colorazione con May Grünwald e Giemsa.

Midollo osseo di coniglio immunizzato contenente pneumococchi. Anormale abbondanza di pseudo-eosinofili. L'animale fu sacrificato 7 giorni dopo l'ultima iniezione di virus.

Fig. 1.

Fig. 2.

V. Puntoni dis. dal vero

Lit. Tacchinardi e Ferrari-Pavia

BIBLIOGRAFIA.

1. Barraud, Ueber extrem. Gangrän in iugend Alter nach infection (*Krank. Deutsch. Zeitschr. f. Chir.*, vol. LIII, 1904).

2. Bezançon et Griffon, Étude expérim. des arthrites à pneumocoques (*Arch. de Méd. exp. et d'Anat. pathol.*, pag. 705, 1899).

3. Bizzozero, *Gazzetta medica lombarda*, gennaio e giugno 1869.

4. Del-Vecchio e Parascandolo, Ricerche sperimentali sul potere piogeno del b. tifico, diplococco, ecc. (*Riforma medica*, vol. I, pag. 340 e 350, 1895).

5. Foà, Sulla infezione da diplococco lanceolato (*Archivio per le Scienze mediche*, vol. XVII, n. 18).

6. Foà e Bordoni-Uffreduzzi, Sulla eziologia della meningite cerebrospinale epidemica (*Ivi*, vol. XI, n. 19).

7. Gabbi, Sull'artrite sperimentale da virus pneumonico (*Lo Sperimentale*, pag. 489 e 577, 1889).

8. Giemsa, *Deutsche Med. Wochenschr.*, n. 12, 1910.

9. Macaigne et Chipault, Remarque sur deux cas d'arthrite à pneumocoques (*Revue de Méd.*, pag. 749, 1891).

10. Massalongo, Patologia della polmonite acuta, Verona 1885.

11. Mattirolo, Arterite diplococcica e gangrena delle estremità (*Gazzetta degli Ospedali e cliniche*, ottobre 1905).

12. Pane, Zur Genese der mittels Methylenblau färbbaren Zellgranulationem bei der Pneum., ecc. (*Centralbl. f. Bakt. u. Paras.*, vol. XVII, pag. 789, 1895).

13. Panichi, Contributo alla patogenesi delle paralisi pneumococciche sperimentali (*Rivista di Patologia nervosa e mentale*, 1904).

14. Idem, Osservazioni ematologiche sulla immunità antipneumococcica sperimentale (*Archivio di Farmacologia sperimentale*, anno IV, vol. IV, fasc. 6°).

15. Patella, La genèse endothéliale des leucocytes mononucléaires du sang, Siena 1910.

16. Schmaltz, *Deutsch. Arch. f. klin. Med.*, fasc. 1°-2°, 1905.

17. Schur u. Loewy, Ueber das Verhalten des Knochenmarks in Krankheiten usw. (*Zeitschr. f. klin. Med.*, vol. XL, pag. 412, 1900).

18. Tizzoni e Fileti, Studi patologici e chimici sulla funzione ematopoietica (*Reale Accad. dei Lincei*, anno CCLXXVIII).

19. Tizzoni e Panichi, Sulla distruzione dello pneumococco nel sangue degli animali immunizzati e ipervaccinati (*Reale Accad. delle Scienze di Bologna*, 24 maggio 1904).

20. Idem, Sulla permanenza dello pneumococco nel sangue di individui guariti di polmonite fibrinosa (*Ivi*, 15 gennaio 1905).

21. TIZZONI e PANICHI, Alcune indicazioni pratiche per la preparazione del siero antipneumococcico (*Reale Accad. delle Scienze di Bologna*, 12 novembre 1905).

22. TOURNIER e COURMONT, Arthrite purulente suraïgue à pneumocoque (*Revue de Méd.*, pag. 681, 1897).

23. VOGELIUS, Les arthrites dans la pneumonie (*Arch. de Méd. exp. et d'Anat. pathol.*, pag. 188, 1896).

24. WASSERMANN M., Pneumococcenschutzstoffe (*Deutsch. Med. Wochenschrift*, n. 9, 1899).

25. WERZBERG, *Virchow's Archiv*, ecc., vol. CCIV, fasc. 2°, 1911.

26. WIESEL, *Wiener Med. Presse*, pag. 6, 1907.

27. WOLOWNIK, Ueber das Verhalten des Knochenmarkszellen bei verschiedenen Krankheiten (*Zeitschr. f. klin. Med.*, vol. LVI, pag. 529, 1905).

serbatoio di testimonianze di fatti, attinte a fonti ben sicure, con le indicazioni esatte della loro primitiva origine; così che questo volume potrà servire, meglio che tutti i libri italiani, come una specie di repertorio allo studioso di una scienza che, a restar ferma contro i violenti attacchi dei suoi nemici, ha bisogno, più che tutte le altre scienze, del granitico fondamento dei fatti.

Animismo e Spiritismo, che dall'aulico Consigliere Alessandro Aksakof fu scritto per dare non altro che una risposta alle pretese antispiritiche di Hartmann, risultò invece il libro fondamentale dello spiritismo scientifico, e per tale venne riconosciuto da uomini dottissimi, fra i quali il Du Prel; e ciò a causa della mente vasta e dell'acume critico del suo autore, che rifuggì sempre dalle meschine concezioni polemiche. Il Prof. Tummolo, tutto compreso dal pensiero di dover dare all'Italia un eccellente trattato *ex professo* di spiritismo, subito capì che quel trattato di scienza spiritica per l'Italia poteva ben essere l'*Animismo e Spiritismo* dell'Aksakof, completato rispetto al materiale dei fatti, al loro genere, alle teorie ed alla parte polemico-dialettica, che ne è la parte più integrale. Ma siccome un'opera così fatta doveva, non solo servire a render dotto lo studioso in tutto ciò che concerne la verità trascendentale della psiche umana, ma anche essere adibito come un prontuario di esempî e teorie dagli scrittori di articoli e di altri libri sulla nuova Scienza dello spirito, il libro venne altresì fornito di un indice alfabetico-analitico speciale, della cui eccezionale utilità pratica il lettore sarà facilmente convinto dall'uso ch'ei dovrà farne nei frequenti casi di riscontro.

Essendo ben nota la competenza dei due prefati autori in ciò che costituisce la scienza pneumatologica dei nostri tempi, e stante il fatto che nessuna nazione possiede un libro quanto questo completo di spiritismo veramente scientifico, noi non sentiamo il bisogno di raccomandare al pubblico italiano l'acquisto del libro, giacchè ognuno saprà da sè stesso riconoscere che esso è, per lo scienziato e per chiunque intenda approfondirsi nello studio di quella pneumatologia che è evidentemente destinata a rivoluzionare la scienza dell'avvenire, un libro fondamentale e quindi indispensabile.

Per la Società

C^e^ GIUSEPPE GALATERI, Direttore.

Un volume in-8° di pag. XVI-938, **Lire QUATTORDICI.**